

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

Faculté de Pharmacie
(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1976

N° 24

THÈSE

pour le

Doctorat en Pharmacie
(Diplômé d'université)

par

Pauline Laurence MPFOUN

Pharmacien

Licenciée-ès-sciences

Née le 15 Novembre 1950 à Maroua (Cameroun)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 18 JUIN 1976

Contribution à l'étude de l'activité protectrice de
l'acide chromone carbohydroxamique - 2 (sel sodique)
vis-à-vis de l'intoxication par le chlorure mercurique.

Président : M. BASTIDE, professeur

Membres du jury : M. TRONCHE, professeur
M. ANDRAUD, professeur

Suppléant : M^{lle} CHATONIER, professeur

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

Faculté de Pharmacie
(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1976

N°

THÈSE

pour le

Doctorat en Pharmacie
(Diplômé d'université)

par

Pauline Laurence MPFOUN

Pharmacien

Licenciée-ès-sciences

Née le 15 Novembre 1950 à Maroua (Cameroun)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 18 JUIN 1976

Contribution à l'étude de l'activité protectrice de
l'acide chromone carboxyhydroxamique - 2 (sel sodique)
vis-à-vis de l'intoxication par le chlorure mercurique.

Président : M. BASTIDE, professeur

Membres du jury : M. TRONCHE, professeur
M. ANDRAUD, professeur

Suppléant : M^{lle} CHATONIER, professeur



UNIVERSITE DE CLERMONT I

Administrateur Provisoire : M. GISCLARD

Secrétaire Général : Mme CHOPART

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. DE PHARMACIE)

Doyen : M. COULET
Vice-Doyen : Mme GAILLARD
Professeurs honoraires : Mme ELANQUET
M. VAURS

I - PROFESSEURS TITULAIRES

MM. BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BERGER	Chimie Analytique
CLUZEL	Bactériologie et Hygiène
COULET	Botanique et Microbiologie
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
Mme POURRAT	Pharmacie Galénique
MM. POURRAT	Matière Médicale
TRONCHE	Pharmacie Chimique

II - PROFESSEURS TITULAIRES

à TITRE PERSONNEL

Mlle CHATONIER : Chimie Pharmaceutique

III - PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. ANDRAUD	Toxicologie
M. COUQUELET	Pharmacie Chimique
Mme PETIT	Chimie Analytique

IV - MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. ALACHE	Pharmacie Galénique
BETAIL	Immunologie
BEYTOUT	Bactériologie et Hygiène
DELATTRE	Chimie Biologique
FOUCHER	Matière Médicale
GUILLOT	Botanique et Microbiologie

Attaché Principal : M. BOURSON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation (Délibération du 6 juin 1956).

En ce début de siècle, nous sommes à l'apogée d'une grande reconnaissance et nous les saluons de la part de l'Université de Pharmacie pour le rôle qu'ils ont joué dans le développement de la science et de la culture.

A mes parents

Mon père et mon mère ont été pour moi des modèles de courage et de dévouement. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de conviction et de persévérance. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de cœur et de passion. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de responsabilité et de solidarité.

Mon père et mon mère ont été pour moi des modèles de courage et de dévouement. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de conviction et de persévérance. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de cœur et de passion. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de responsabilité et de solidarité.

A ma famille

Mon père et mon mère ont été pour moi des modèles de courage et de dévouement. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de conviction et de persévérance. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de cœur et de passion. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de responsabilité et de solidarité.

Mon père et mon mère ont été pour moi des modèles de courage et de dévouement. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de conviction et de persévérance. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de cœur et de passion. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de responsabilité et de solidarité.

A André N'GANGUIA

Mon père et mon mère ont été pour moi des modèles de courage et de dévouement. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de conviction et de persévérance. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de cœur et de passion. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de responsabilité et de solidarité.

Mon père et mon mère ont été pour moi des modèles de courage et de dévouement. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de conviction et de persévérance. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de cœur et de passion. Ils ont été les premiers à m'apprendre que la science est une affaire de responsabilité et de solidarité.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548618_0015

AVANT-PROPOS

En ce début de travail, nous tenons à témoigner notre profonde reconnaissance à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué.

Monsieur le Professeur BASTIDE nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son Laboratoire. Il nous a confié le sujet de cette thèse et nous a sans cesse orienté dans nos recherches. Nous tenons à le remercier pour la bienveillance dont il a toujours fait preuve à notre égard. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude et de notre profond dévouement.

Monsieur le Professeur TRONCHE a partagé avec Monsieur le Professeur BASTIDE la direction de cette thèse. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur ANDRAUD nous a fait profiter de son expérience et de sa compétence. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Mademoiselle le Professeur CHATONIER a toujours manifesté beaucoup d'intérêt à notre égard. Qu'elle soit assurée de notre sincère reconnaissance.

Nous remercions très vivement Monsieur Fialip qui a été notre guide tout au long de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous associons à nos remerciements tout le personnel des laboratoires de Chimie Biologique et Pharmacodynamie, ainsi que le personnel du laboratoire de Pharmacie Chimique, dont l'aide nous a été précieuse.

INTRODUCTION

Ce travail s'inscrit à la suite de celui de Monsieur Fialip (52, 53) dans le cadre de la collaboration de deux laboratoires, celui de Pharmacie Chimique et celui de Chimie Biologique et Pharmacodynamie.

Un dérivé original, l'acide chromone carbohydroxamique-2 (sel sodique) a montré des propriétés protectrices intéressantes, tant *in vitro* qu'*in vivo*, vis-à-vis d'intoxications expérimentales par des ions mercuriques.

La partie consacrée aux recherches bibliographiques groupe des généralités sur l'étude du comportement des agents chélateurs d'un point de vue chimique (chapitre I), biochimique (chapitre II) et pharmacologique (chapitre III). Cette étude a été complétée dans le chapitre IV par quelques monographies.

La partie consacrée aux recherches expérimentales complète tout d'abord l'étude comparative de l'activité protectrice de l'acide chromone carbohydroxamique-2 (sel sodique) vis-à-vis de l'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris (chapitre I) et de l'inhibition mercurique de la lactate déshydrogénase *in vitro* (chapitre II). Nous avons approfondi cette étude en recherchant son influence sur l'excrétion urinaire et fécale du mercure chez cet animal (chapitre III). Dans le chapitre IV, nous avons discuté des résultats obtenus afin de mettre en lumière le mode d'action de ce dérivé.

ABREVIATIONS UTILISEES

A. D. N.	:	Acide désoxyribonucléique.	.
A. R. N.	:	Acide ribonucléique.	
A. T. P.	:	Adenosine triphosphate.	
L. D. H.	:	Lactate déshydrogénase.	
N. A. D. ⁺	:	Nicotinamide adénine dinucléotide.	
N. A. D. H.	:	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.	

EXPRESSION DES RESULTATS

Sur les différents tableaux et figures sont indiqués :

- la moyenne arithmétique (M) des résultats expérimentaux obtenus.
- l'intervalle de confiance 95 p. 100 (α) d'après la distribution de Student.

PREMIERE PARTIE

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

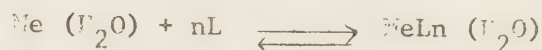
CHAPITRE I

CATIONS MÉTALLIQUES ET CHÉLATION

I. GENERALITES.

Les cations métalliques peuvent donner des complexes en se liant avec un ou plusieurs atomes ou groupes d'atomes neutres ou chargés négativement. Le nombre de liaisons possibles est de deux pour l'argent et le mercure, quatre pour le cuivre et le zinc, six pour le fer, le cobalt, le chrome et huit pour le thorium. Les groupes d'atomes donneurs d'électrons sont appelés ligands, les complexes formés étant les chélates.

On peut mesurer la constante de stabilité K des complexes formés d'après la loi d'action de masse :



$$K = \frac{|MeLn|}{|Me||L|^n}$$

Des constantes de stabilité très précises ont été déterminées (69, 118, 119, 122, 160).

II. STABILITE DES COMPLEXES FORMES.

Un certain nombre de facteurs liés au cation influent sur la stabilité des complexes formés (1, 76, 127, 131, 149).

1) Facteurs liés aux propriétés électroniques de l'élément métallique :

A partir des chélates métalliques du dibenzoylméthane, des relations ont pu être établies entre la constante de stabilité et l'électro-

négativité (157), le rayon ionique ou le potentiel d'ionisation (30).

2) Facteurs liés au ligand donneur d'électrons : Théorie du champ de ligand : (105).

Sous l'action d'un ligand donneur d'électrons, il se produit un réarrangement des électrons au niveau des couches périphériques du cation.

Les sous-couches 3d, 4s, 4p ont des niveaux énergétiques très voisins.

Nous envisagerons successivement l'exemple du fer, du cobalt, du cuivre et du zinc. (105).

A) Exemple du Fer : 56 électrons

sous-couche :	3d	4s	4p
nombre d'orbitales :	5	1	3
nombre d'électrons :	6	2	0
Fe	↑↓ ↑ ↑ ↑ ↑	↑↓	
Fe ⁺⁺	↑↓ ↑ ↑ ↑ ↑		

Si on ajoute un ligand comme CN⁻, donneur d'électrons, il se produit un réarrangement en trois orbitales 3d de basse énergie et deux orbitales 3d de haute énergie, tous les électrons périphériques occupant les orbitales 3d de basse énergie. On obtient ainsi six orbitales libres.

Fe⁺⁺ a alors la structure suivante :



Six doublets pourront être acceptés, ce qui rend possible la formation de six liaisons de coordination pour le fer.

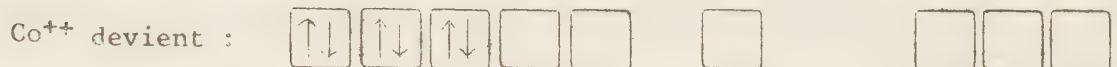
Pour Fe⁺⁺⁺, on aura un électron en moins sur la sous-couche 3d. Les complexes ferriques sont moins stables que les complexes ferreux qui ont leurs couches périphériques saturées.

B) Exemple du Cobalt :

sous-couche :	3d	4s	4p
nombre d'orbitales :	5	1	3
nombre d'électrons :	7	2	0



En présence de CN⁻ :



Co⁺ a un électron en plus sur la sous-couche 4d

Co⁺⁺⁺ n'a aucun électron sur la même sous-couche.

Pour le Cobalt, il se forme aussi six liaisons de coordination.

C) Exemple du Cuivre :

sous-couche :	3d	4s	4p
nombre d'orbitales :	5	1	3
nombre d'électrons :	10	1	0



En présence de CN⁻, Cu⁺ garde la même structure, et il n'y aura formation que de quatre liaisons de coordination.

Avec Cu⁺⁺, on a un électron en moins sur la sous-couche 3d et les complexes formés sont moins stables.

D) Exemple du Zinc :

sous-couche :	3d	4s	4p
nombre d'orbitales :	5	1	3
nombre d'électrons :	10	2	0



En présence de CN^- , la sous-couche 3d étant saturée, il se forme aussi quatre liaisons de coordination.

Les propriétés d'un chélate dépendent donc beaucoup du donneur d'électron (148).

Dans le cas du fer, le ligand le plus donneur d'électrons est CN^- . Puis par ordre décroissant, on rencontre successivement les groupes ou molécules suivants : (155)

orthophenantroline, NO_2 , EDTA, NH_3 , SCN^- , H_2O , COO^- , OH

Dans l'organisme, les ligands les plus donneurs d'électrons seront par ordre décroissant :

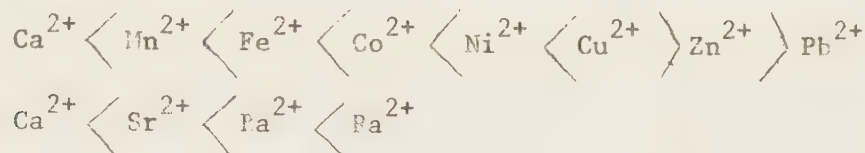
- le noyau imidazole de l'histidine
- le groupement $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-$ de l'arginine
- le groupement amidé $-\text{CONH}_2$ de l'asparagine et de la glutamine
- le groupement aminé $-\text{NH}_2$ de la lysine
- le groupement sulfhydryle SH de la cystéine
- le groupement carboxyle COO^- de l'aspartate et du glutamate
- le groupement hydroxyle $-\text{OH}$ de la tyrosine.

III. APTITUDE DES METAUX A SE COMPLEXER.

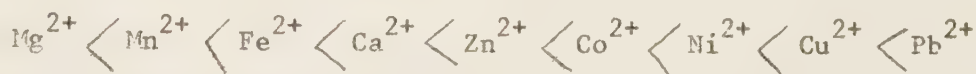
Schwarzenbach(127) classe les cations en trois groupes selon leur tendance à se complexer.

- groupe A : cations à configuration de gaz noble :
 - * métaux alcalins : K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Li^+ , Na^+ .
 - * alcalino-terreux : Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++}
 - * Al^{+++}
- groupe B : Cations à sous-couches d complètes (10 électrons) :
 - Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Zn^{++} , Cd^{++} , Hg^{++}
- groupe C : Métaux de transition à sous-couches incomplètes :
 - Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn.

Irving et Williams (77) ont établi un ordre préférentiel de formation des chélates :



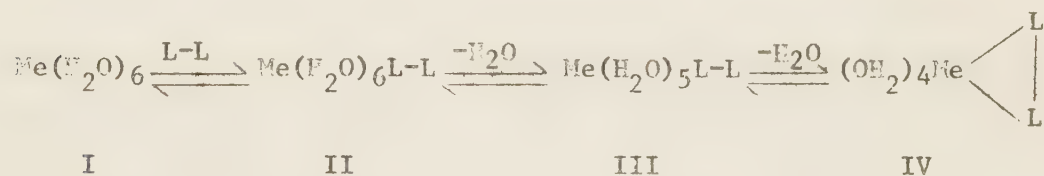
Cet ordre n'est pas rigoureux pour tous les ligands ainsi que le prouve l'ordre établi par Mellor et Malley (93) sur les chélates du salicylaldéhyde. En effet, le copule organique influe, dans une certaine mesure, sur les stabilités relatives des chélates métalliques.



Parmi les métaux usuels rencontrés dans l'organisme, le cuivre, qui se situe au plus haut de ces deux échelles doit donc donner les chélates les plus stables. Il peut éventuellement déplacer d'autres métaux liés à une molécule organique. Ceci n'est pas le cas des métaux alcalins qui possèdent les potentiels d'ionisation les plus bas.

IV. MECANISME DE LA CHELATION (44, 45).

Tous les ions métalliques en solution sont hydratés. Les molécules d'eau peuvent être remplacées par d'autres ligands pour donner des complexes.



Le ligand est un donneur de doublet électronique et agit comme une base alors que l'ion métallique, acceptant la paire d'électrons, fonctionne comme un acide (117).

Le mécanisme est de type SN_1 ($\text{I} \rightarrow \text{II} \rightarrow \text{III}$), suivi probablement par un mécanisme SN_2 ($\text{III} \rightarrow \text{IV}$) qui provoque la fermeture rapide du cycle.

C H A P I T R E I I

LA CHELATION EN BIOCHIMIE

I. GENERALITES.

Au niveau cellulaire, il existe des agents chélateurs naturels qui semblent jouer un rôle important. Des expériences ont montré que tous les organismes ont une concentration optimale en un métal donné. En deçà et au-delà de cette concentration la croissance est compromise. Piper (110) en particulier a cultivé de jeunes plants d'avoine dans un milieu de teneur variable en cuivre.

Parmi les chélateurs trouvés dans les cellules vivantes, on rencontre tout d'abord les acides aminés. L'affinité de certains d'entre eux est représentée sur le tableau I. Cette affinité est exprimée par le logarithme de la constante de stabilité du complexe formé. Les équilibres habituellement mesurés par potentiométrie suivent la loi d'action de masse (30).

	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Co ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Cu ⁺⁺
Glycocolle	2	3	4	5	5	6	8,5
Histidine	-	3,5	5	7	7	9	10,5
Cystéine	-	4	6	9	10	10	-

Tableau I : Logarithme des constantes de stabilité de quelques acides aminés (H₂O / 20°C).

Les constantes de stabilité de la plupart des acides aminés sont du même ordre de grandeur que celle du glycocolle (3 , 4). Cependant, l'histidine et la cystéine complexent les métaux plus fortement que le glycocolle. On pense d'ailleurs que la plupart des métaux lourds liés aux protéines utilisent le noyau imidazole de l'histidine, ou le groupement thiol de la cystéine (5).

Dans l'ensemble, les peptides et les protéines que nous étudierons également ont moins d'affinité pour les métaux que les acides aminés libres, car la formation de chaque liaison peptidique utilise les électrons donnés par les groupements acide carboxylique et amine (5).

Parmi les chélateurs naturels, il existe également des acides organiques comme l'acide citrique (9).

Tous ces agents influencent fortement la distribution des métaux essentiels dans l'organisme.

Il est possible que le transport plasmatique du fer, du cuivre et d'autres métaux se fasse grâce à la formation de complexes avec des protéines spéciales ; c'est le cas de la ferritine, la céruloplasmine (82)

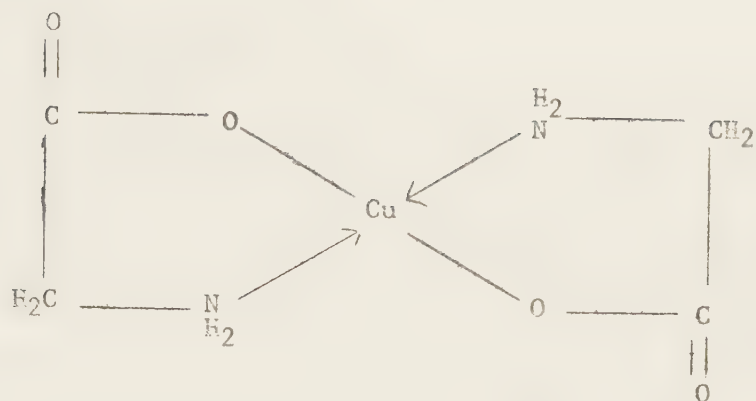
II. CHELATEURS NATURELS.

1) Acides aminés :

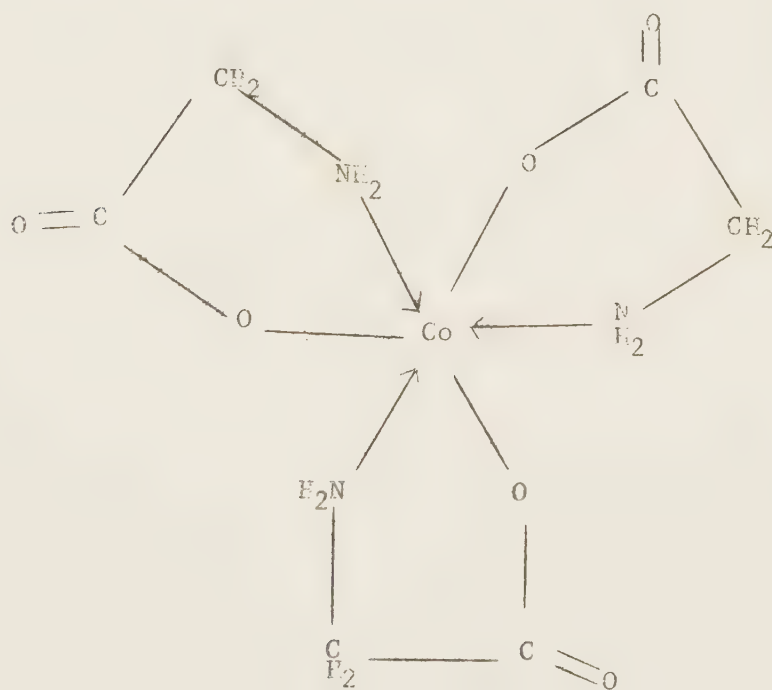
Les études sur la structure des complexes formés ont surtout porté sur le glycocolle et la cystéine.

A) Le glycocolle :

Il peut former des complexes avec le cuivre (128), le chrome (87), le cobalt (143).



Un atome de cuivre est lié à deux molécules d'acides aminés. Il se forme donc un complexe 2 : 1.

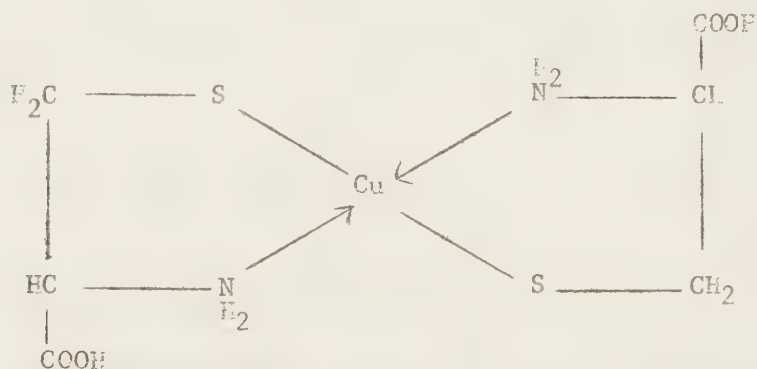


Avec le cobalt et le chrome, on observe la formation d'un complexe trivalent (3 : 1).

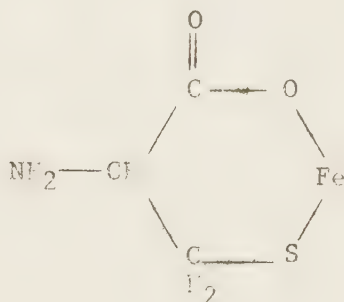
B) La cystéine :

La cystéine forme des complexes avec de nombreux métaux, en particulier le zinc, le cuivre, le fer, le cobalt et le molybdène.

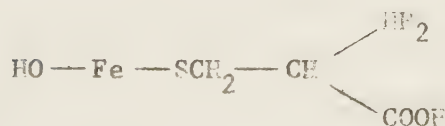
a) Avec le cuivre, il se forme un complexe à pH supérieur à 8, de couleur jaune, ayant un pic d'absorption à 330 nanomètres (26).



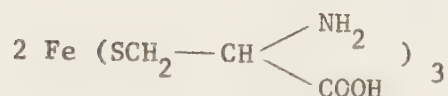
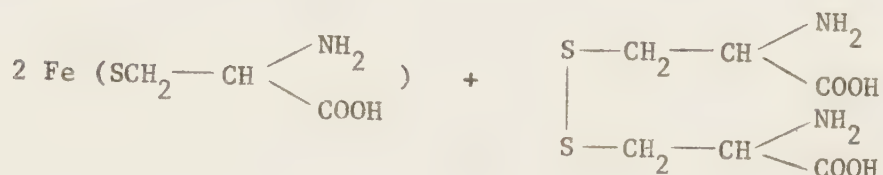
b) Avec le fer ferreux, la cystéine forme de nombreux complexes, le plus stable en solution acide étant le complexe 1 : 1 (4)



A pH plus élevé, il existe deux autres formes :

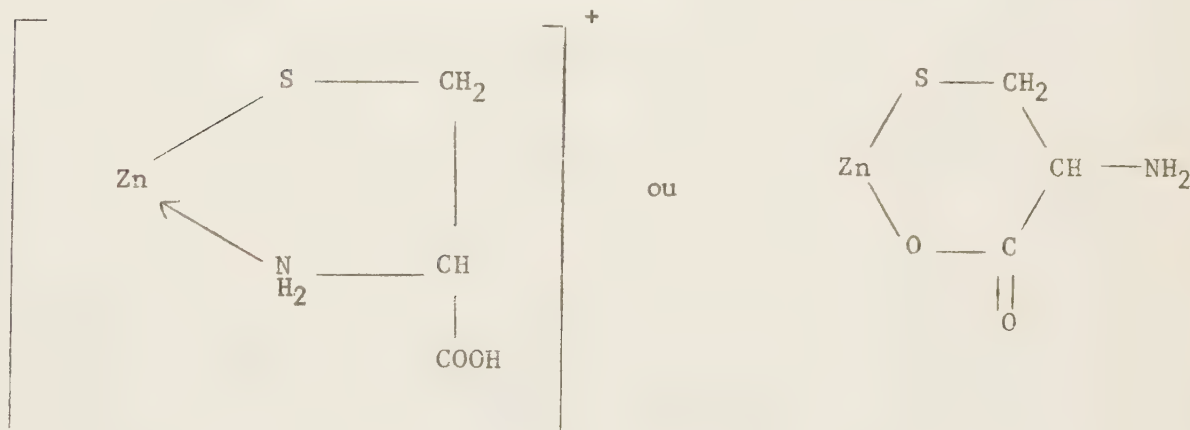


Les complexes ferriques se forment également soit directement, soit par addition de cystine au complexe ferreux précédent :

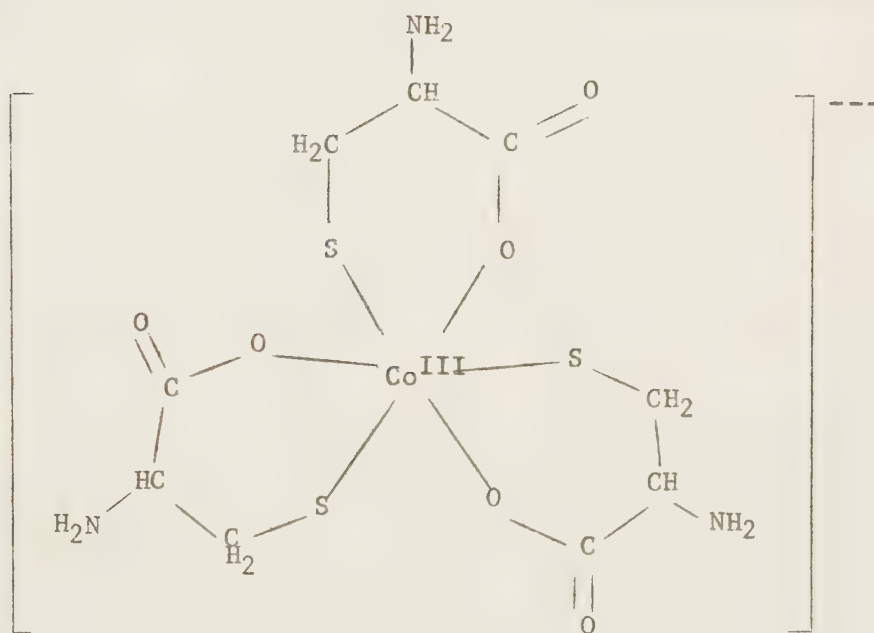
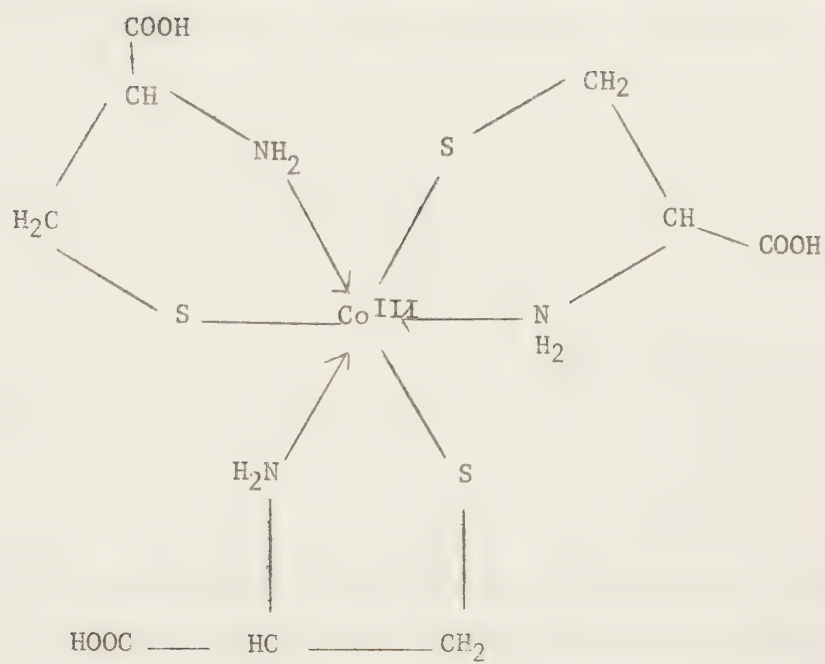


Ce complexe ferrique est bleu-violet.

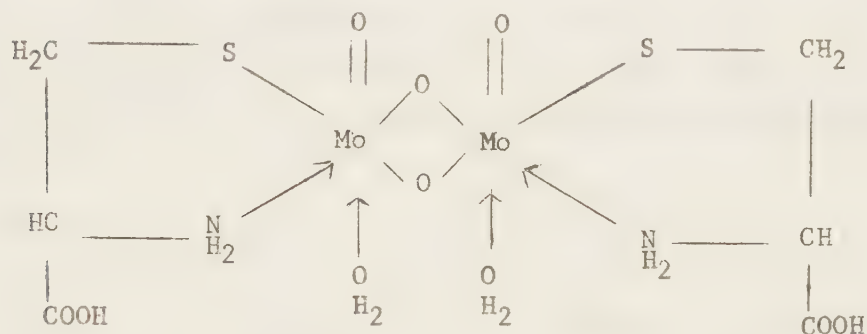
c) Le complexe zinc-cystéine peut exister sous deux formes : (67)



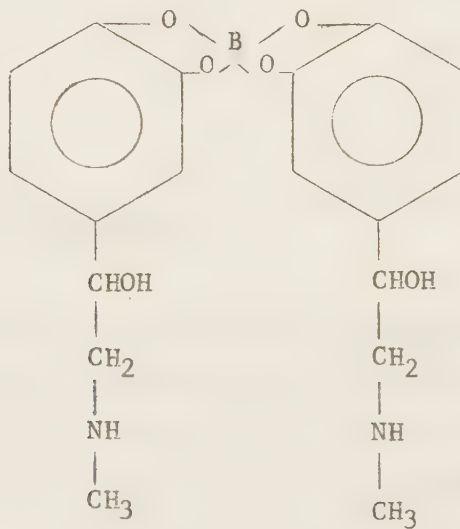
d) Le cobalt forme avec la cystéine des complexes stables, correspondant aux états bivalent (Co^{II}) et trivalent (Co^{III}). Nous donnons ici les formules des deux isomères possibles formés avec le cobalt trivalent.



e) Les chélates que forment la cystéine et le molybdène ont également été étudiés (78). Leur structure est la suivante :

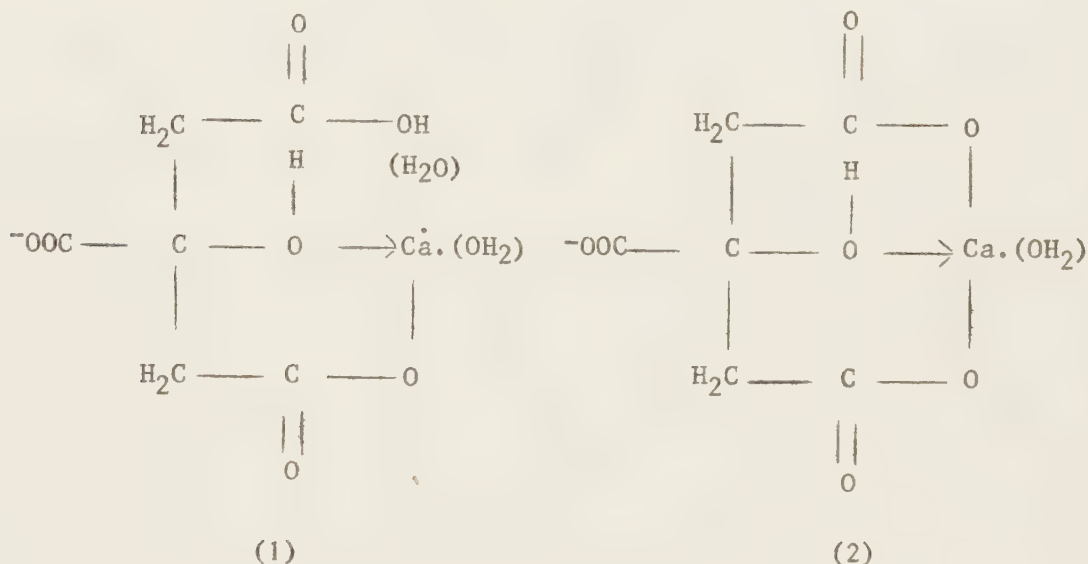


C) Ces phénomènes de chélation sont importants au niveau de la protection de l'adrénaline, dont l'oxydation est catalysée par le cuivre. Les acides aminés tels que la cystéine, la tyrosine, et des composés comme la vitamine C chélatent le cuivre, ce qui empêche donc cette oxydation (9). Par ailleurs, l'adrénaline chélate le bore :



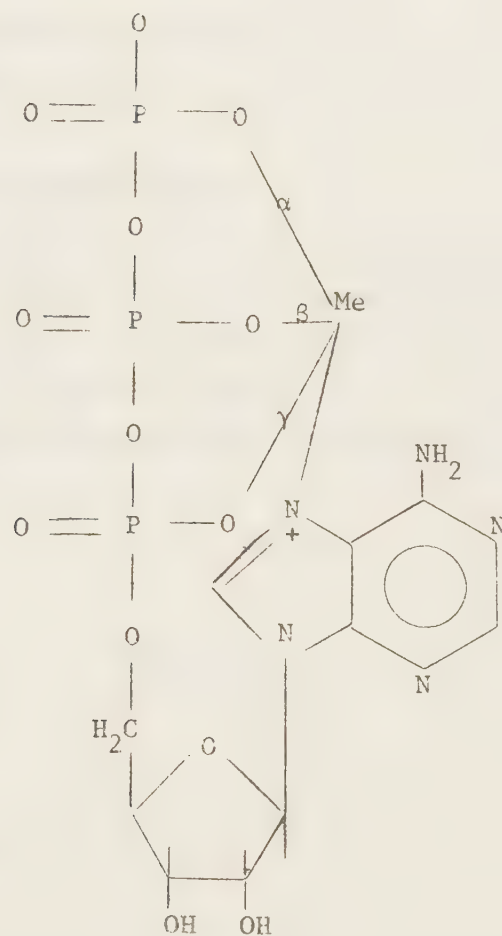
2) Acides organiques :

Les complexes citrate calcique sont d'une grande importance biologique, puisque le métabolisme de l'acide citrique paraît dépendre des hormones parathyroïdiennes. Ils sont très stables en raison de la charge négative de l'ion citrate. Les structures probables sont les suivantes (9) :



3) Bases azotées - Nucléotides :

Les purines, les ptérines et la spermine sont des substances chélatrices largement distribuées dans la nature. Elles ont à peu près les mêmes affinités que les acides aminés. Il en est de même pour les nucléotides, en particulier l'adénosine triphosphate (ATP). Les complexes métalliques de l'ATP (135,32,84) et de l'ADP en solution sont des structures dans lesquelles les oxygènes des phosphates et les azotes de l'adénine sont des ligands pour le métal (91).



Suivant le métal chélaté, on aura formation de liaisons de coordination selon le tableau suivant :

Métal	Liaisons de coordination formées
Mg ⁺⁺	β, γ
Mn ⁺⁺	α, β, γ
Zn ⁺⁺	β, γ
Co ⁺⁺	α, β, γ
Cu ⁺⁺	β, γ

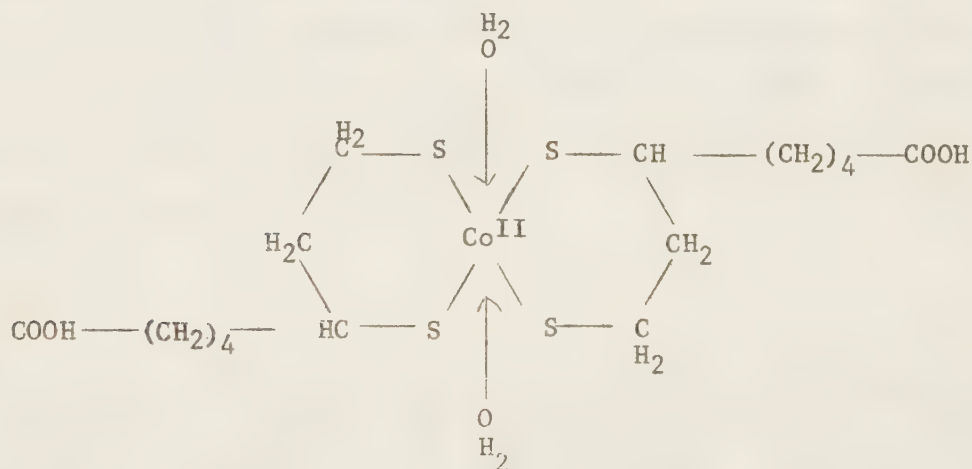
Tableau II.

4) Coenzymes :

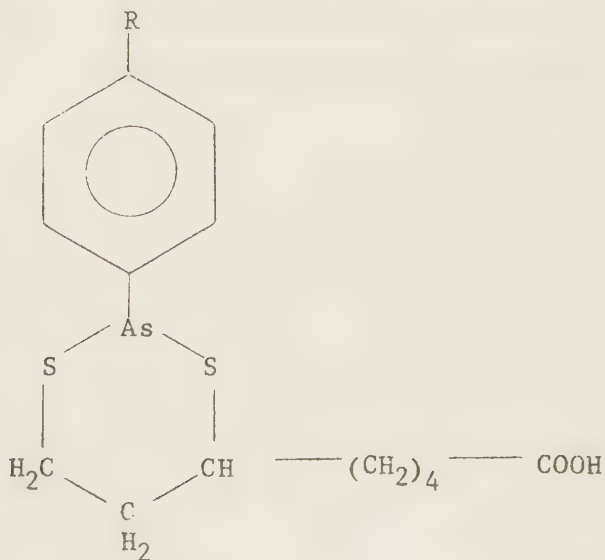
De nombreux coenzymes sont des agents chélateurs. Nous envisageons ici deux exemples.

A) Le dihydrolipoate :

Il possède deux groupements thiols et provient de la réduction de l'acide lipoïque. Ce dernier est attaché par covalence à l'enzyme par une liaison entre son groupe carboxyle et le groupe ϵ -aminé d'un résidu de lysine de la protéine enzymatique. Les deux groupements thiol permettent au dihydrolipoate de se lier en particulier au cobalt (154).



Il forme également des complexes avec l'arsenic, en particulier l'arsenic organique (68, 114).



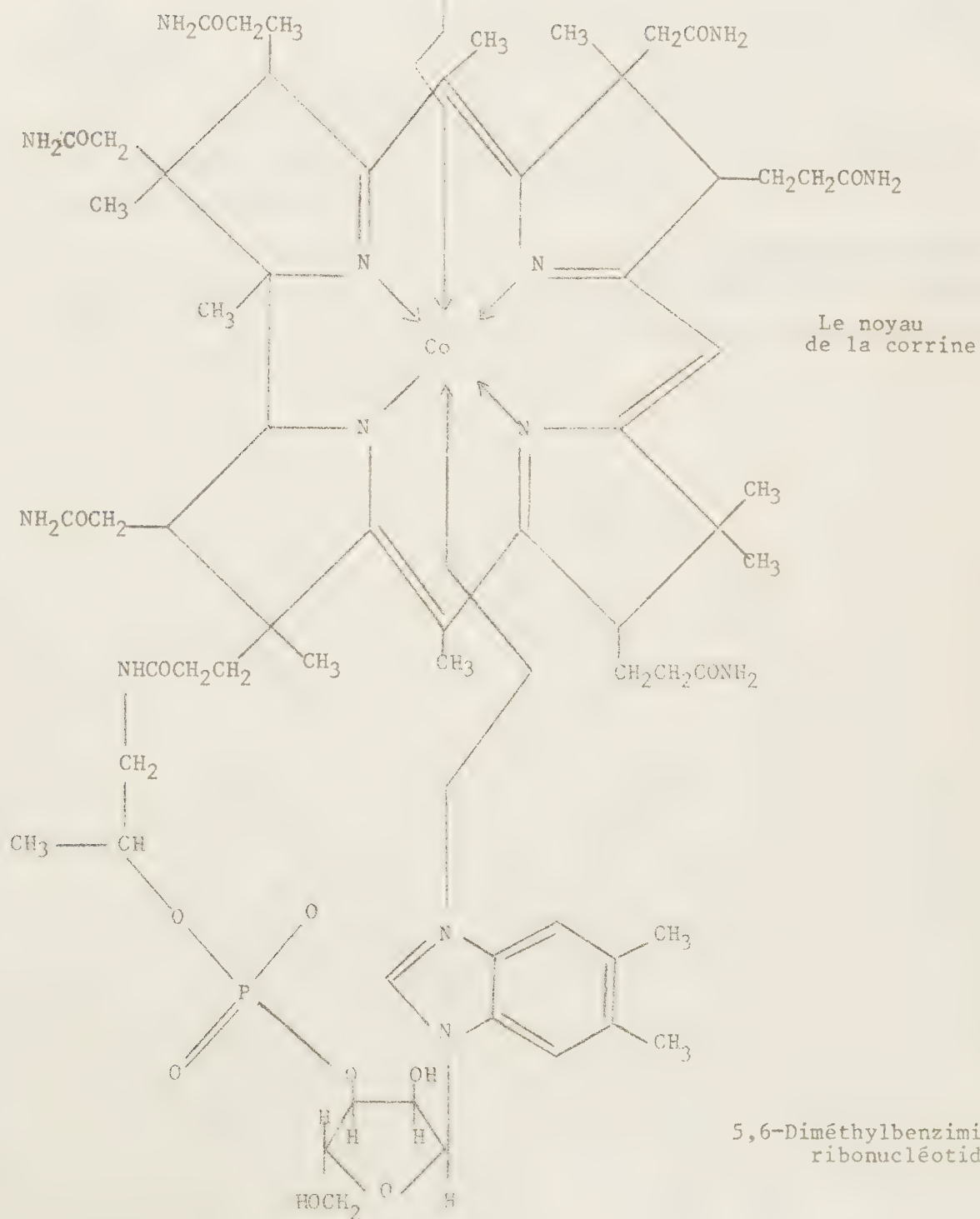
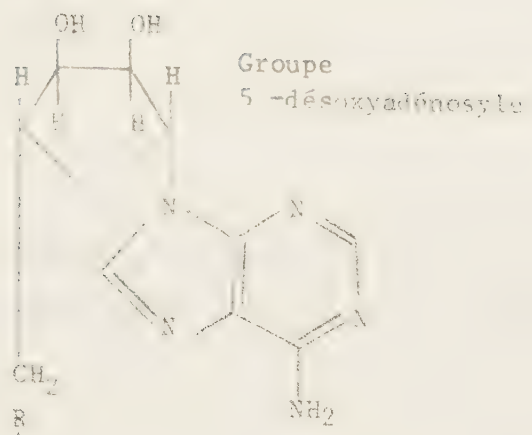
B) La vitamine B₁₂ :

Elle possède deux composants caractéristiques :

- Le premier est un nucléotide de structure exceptionnelle, puisque sa base est un 5,6 -diméthylbenzimidazole, lié à un D-ribose par une liaison glucosidique α . Il contient également un groupe phosphate en position 3'.
- Le second composant de la molécule, le plus caractéristique, est le noyau corrine, qui contient quatre noyaux pyrrole. Deux des noyaux sont reliés directement et non par l'intermédiaire d'un pont méthène. Un atome de cobalt est coordonné aux quatre atomes d'azote internes du noyau corrine. C'est le 5' desoxyadenosyle qui représente la forme coenzymatique active.

La vitamine B₁₂, sous la forme d'un coenzyme à cobamide participe à de nombreuses réactions d'isomérisation, comportant des réarrangements du squelette carboné (63, 73).

Les réactions les plus étudiées concernent celles catalysées par la dioldehydrase (12,115,123,161).



5) Les Protéines :

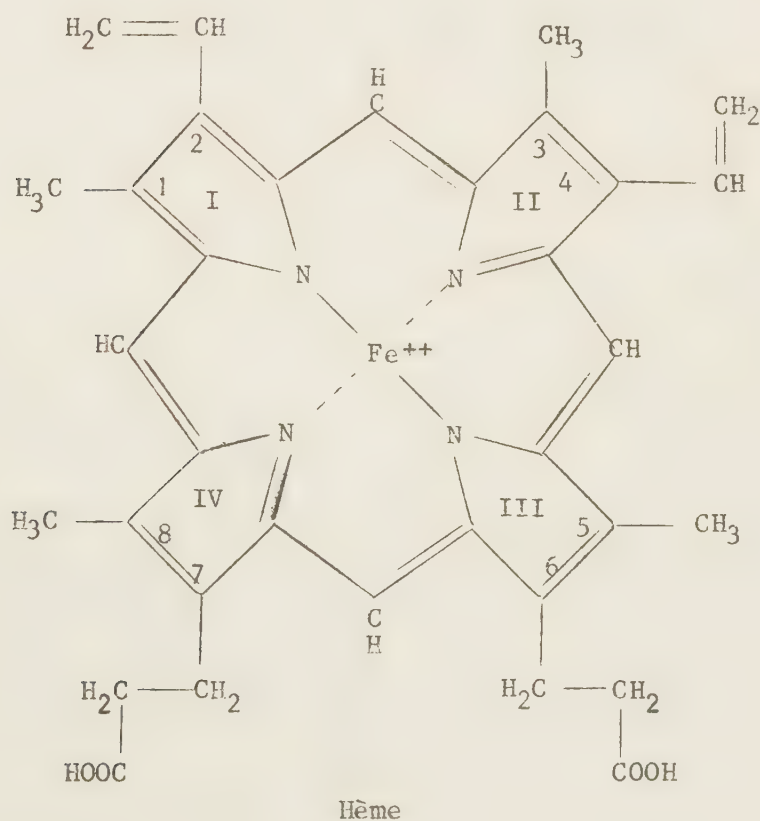
Elles possèdent de nombreux groupements capables de jouer le rôle de donneur de doublet électronique. Dans notre étude, nous envisageons trois exemples.

A) L'Hémoglobine :

C'est une protéine caractérisée par la présence d'un groupement prosthétique porphyrine-fer, constituant le noyau hémique. Celui-ci se rencontre aussi dans les cytochromes de la chaîne respiratoire.

Les porphyrines forment des complexes chélatés quadridentés avec les métaux tels que le fer, le magnésium, le zinc, le nickel, le cobalt et le cuivre (83).

Les quatre groupes ligands de la protoporphyrine constituent un complexe plan carré avec le métal. Les positions cinq et six de coordination du fer, qui ne sont pas engagées, sont disposées perpendiculairement par rapport au plan du noyau porphine.



Dans l'hémoglobine, les atomes de fer ne changent pas de valence et demeurent à l'état de fer ferreux. Cependant dans les cytochromes, les atomes de fer subissent un changement réversible de valence entre les formes Fe^{++} et Fe^{+++} . Cette propriété en fait des transporteurs d'électrons, alors que l'hémoglobine et la myoglobine agissent comme transporteurs de ligands.

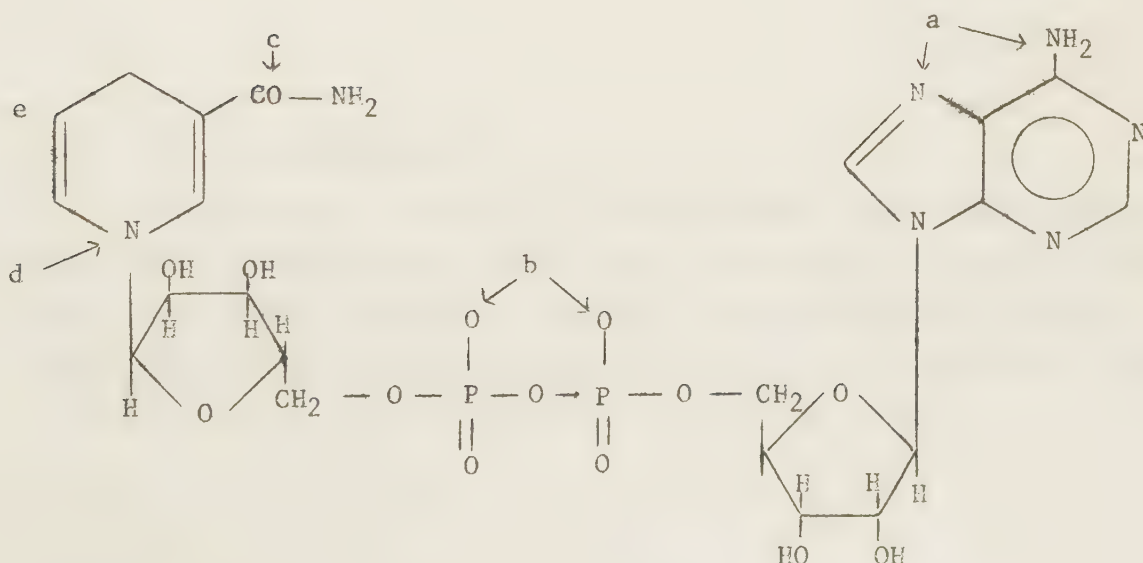
B) Il existe aussi des protéines ferriques non hémiques qui jouent un rôle de transporteurs d'électrons. C'est par exemple le cas de la ferredoxine. Le mécanisme a été détaillé par Taube et Basolo (13,65,116,138).

C) Déshydrogénases :

Dans les cellules animales, de nombreuses déshydrogénases contiennent du zinc, métal qui ne subit pas les réactions d'oxydo-réduction.

Le rôle du zinc a été longuement discuté, et reste encore inconnu. Il pourrait se lier au nicotinamide adénine dinucléotide réduit ($\text{NADH} + \text{H}^+$) à différents niveaux :

- l'adénine (a) (151)
- le pyrophosphate (b) (81)
- le groupement carbonyle (c) (48)
- l'azote du cycle pyridone (d) (106)
- le carbone C^5 du nicotinamide (e) (88)

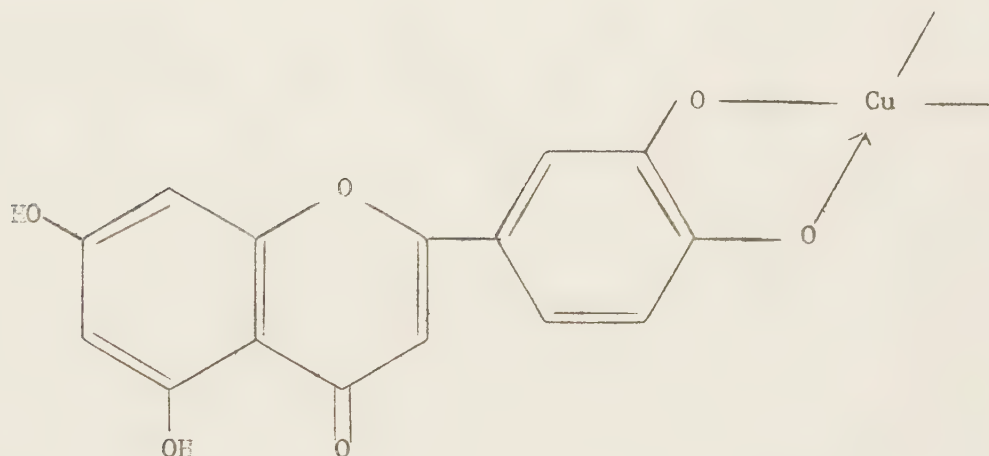


Le zinc dans les déshydrogénases pourrait servir à enlever les électrons σ de la liaison O-H de l'éthanol, ce qui faciliterait le départ du proton. Il servirait également à enlever les électrons π et σ du groupement carbonyle de l'acétaldéhyde pour faciliter le transfert de l'hydrogène (81).

6) Chélateurs chez les végétaux :

A) Les Flavonoïdes :

Parmi les flavonoïdes, la quercétine en particulier chélate le cuivre (29).

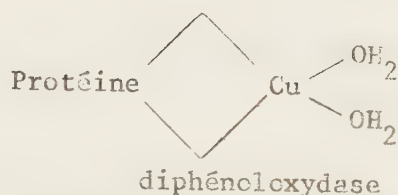
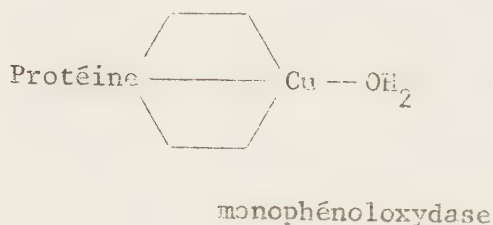


B) La chlorophylle :

Elle est à la base de la photosynthèse et est constituée par quatre noyaux pyrrole substitués, dont l'un est réduit. Les noyaux pyrrole sont disposés suivant une structure macrocyclique dans laquelle les quatre atomes d'azote centraux sont coordonnés à un ion magnésium, formant une structure très stable située dans un seul plan (83).

C) Les oxydases :

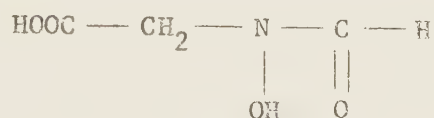
Le cuivre se lie également aux oxydases, en particulier les phénol oxydases (10).

7) Chélateurs des microorganismes :

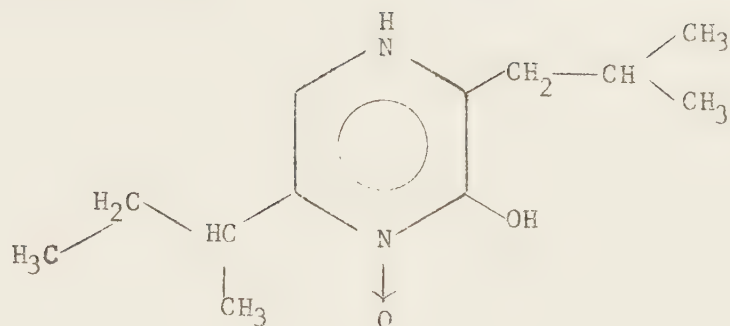
Les bactéries et les champignons produisent une grande variété d'agents chélateurs. On y trouve surtout des composés à fonction hydroxylamine, et des antibiotiques originaux chélatant les métaux alcalins.

A) Chélateurs produits par les bactéries :a) Composés à fonction hydroxylamine

* L'hadacidine : est isolée du milieu de culture d'un certain nombre d'espèces de *Penicillium*. Elle possède des propriétés antitumorales et agirait comme un antagoniste de l'acide aspartique(107). C'est un acide monohydroxamique.

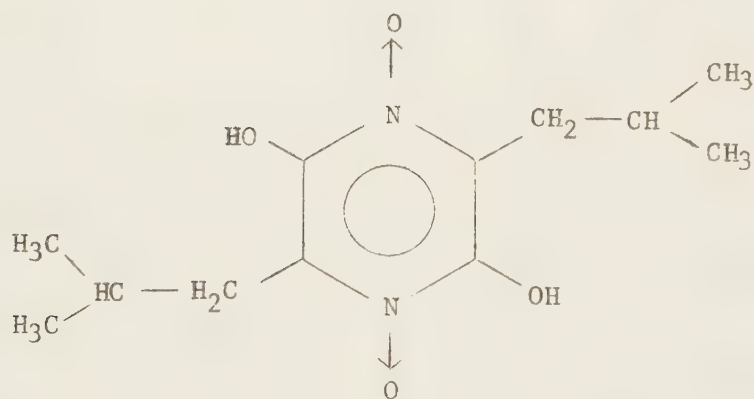


* L'acide aspergillique : antibiotique isolé du milieu de culture d'*Aspergillus flavus*. Il se forme dans l'organisme à partir de leucine et d'isoleucine (43).

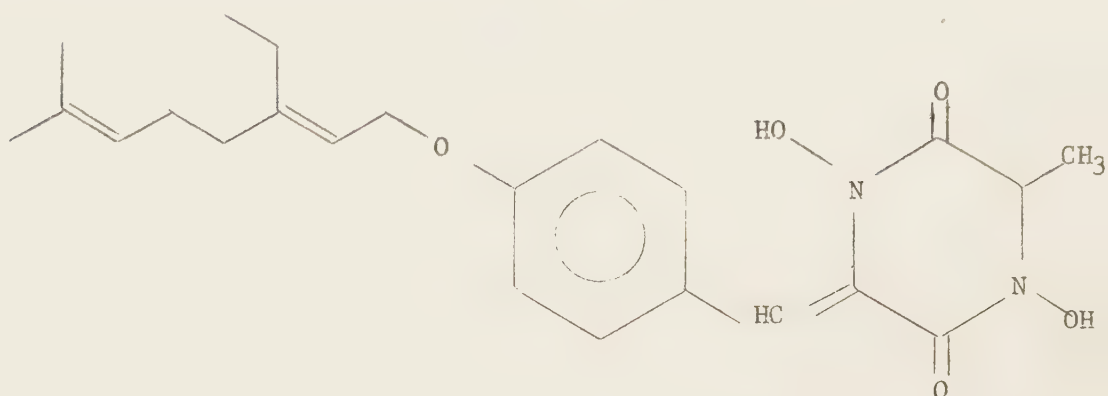


Son activité antibiotique est diminuée par le fer (22), et augmentée par le cobalt, le nickel, le zinc, l'arsenic et le bismuth.

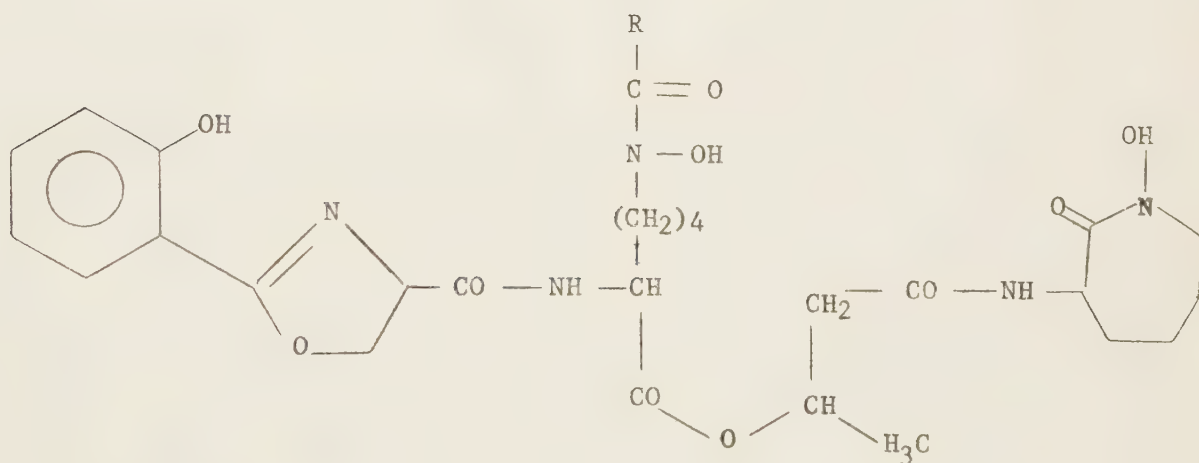
* L'acide pulcherrimique : antibiotique isolé du milieu de culture de *Candida pulcherrima* (34).



* Le mycelianamide : est produit par *Penicillium griseo fulvum* (17).
Il possède deux fonctions hydroxylamine

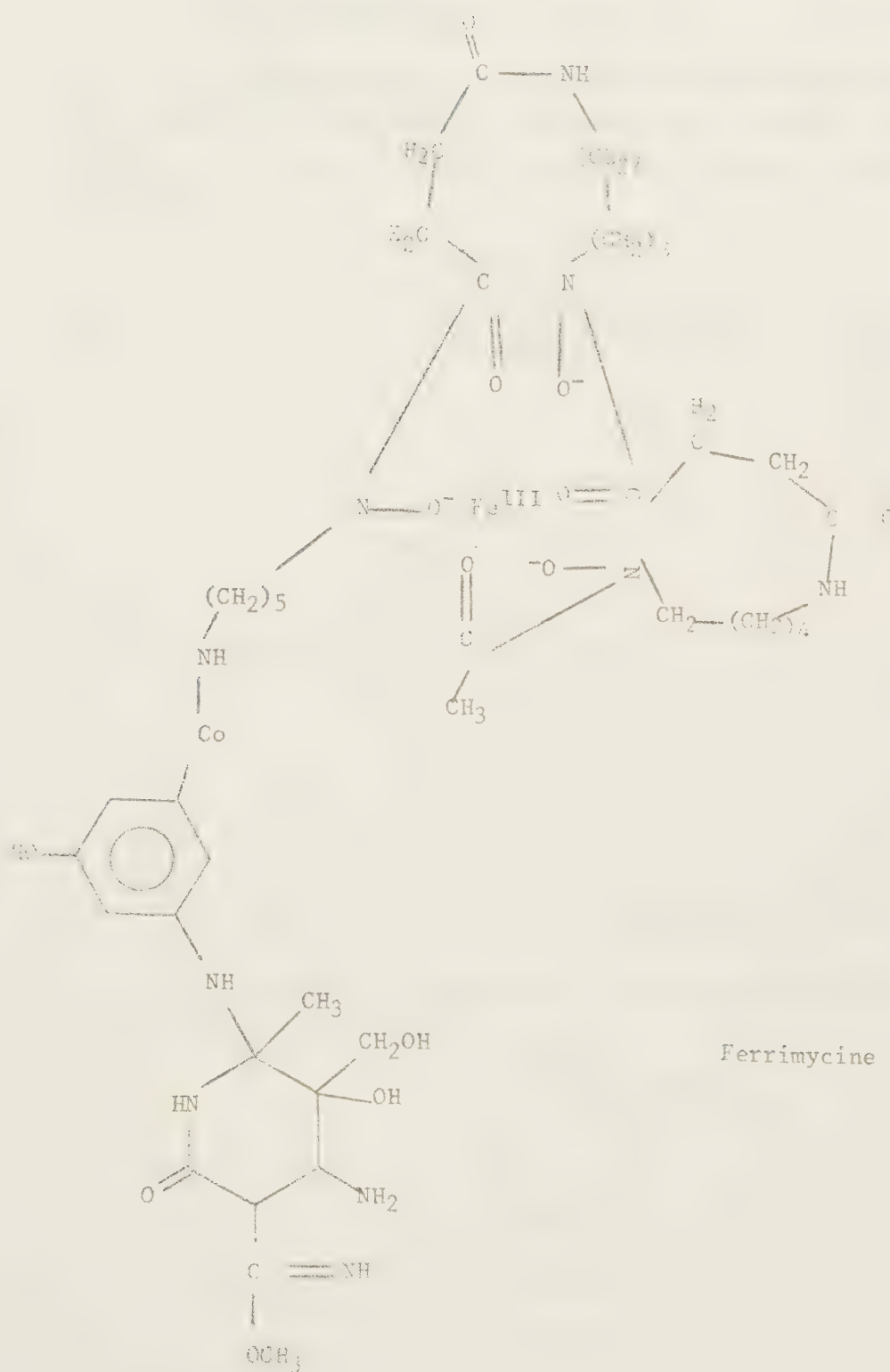


* La mycobactine T : c'est un facteur de croissance pour les seuls *mycobacterium*. Elle chélate le fer par ses deux groupes hydroxylamine (133).



R = C₁₄ - 21

* On distingue aussi des antibiotiques à fonction trihydroxylamine comme l'albomycine (94,95) et la ferrimycine A₁ (79) qui contiennent du fer. L'activité antibiotique cesse en cas de perte de ce fer. Mais les phléomycines et les bléomycines (75, 147) qui contiennent du cuivre gardent leur activité en cas de perte du métal.

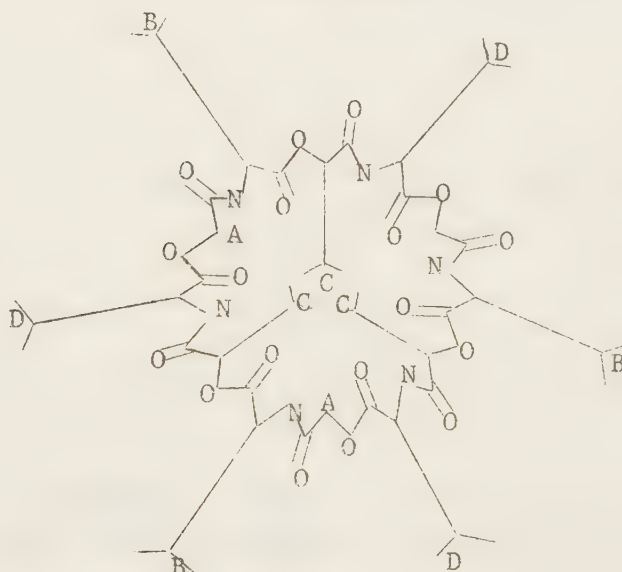


Ferrimycine A₁

b) Les antibiotiques ionophores :

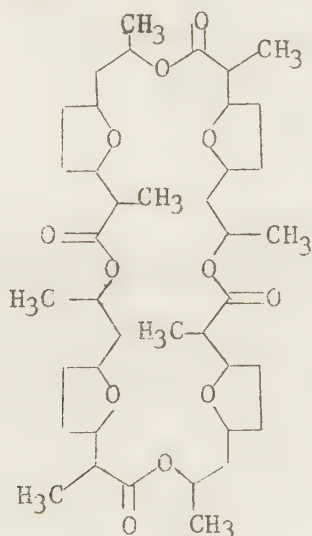
* La valinomycine : est produite par *Streptomyces fulvissimus*. Elle résulte de l'assemblage de deux moles de L-valine, deux moles de D-valine, deux moles d'acide L-lactique et deux moles d'acide D-hydroxy isovalérique (21)

A = L-Lactate
B = L-Valine
C = D-Hydroxyisovalérate
D = D-Valine



Elle chélate le potassium, le rubidium et le césium (104).

* La nonactine : appartient au groupe des macrotétrolides produits par des *strepto mycètes*. (158)



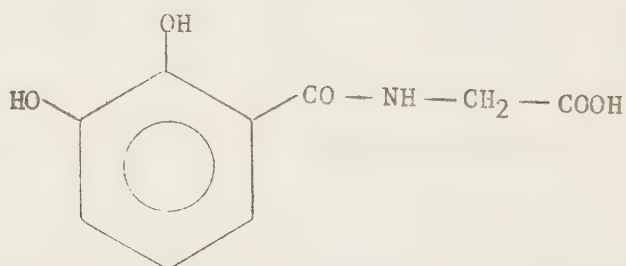
Elle chélate le potassium.

* La gramicidine est isolée du milieu de culture d'une souche de *Bacillus brevis*.

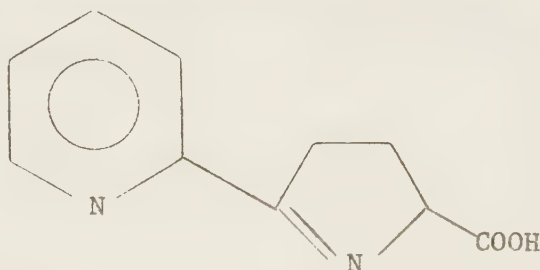
Elle chélate les ions potassium, sodium, lithium, rubidium et césium.

c) Divers :

* L'acide itoïque : est un facteur de croissance extrait de *Bacillus subtilis*. Il chélate spécifiquement le fer ferrique (130).



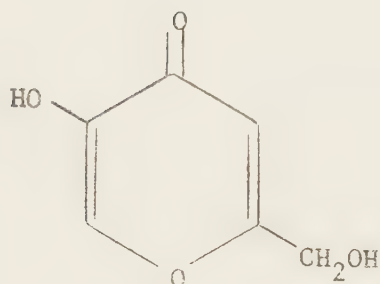
* La pyrimine : c'est un facteur de croissance extrait d'un milieu de culture de *Pseudomonas*. Elle chélate spécifiquement le fer ferreux (130).



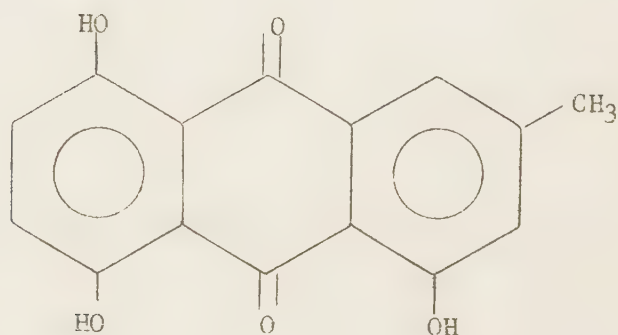
B) Chélateurs produits par les champignons :

Les champignons ont des agents de chélation qui leur sont spécifiques, comme la plupart des pyrones et certaines anthraquinones.

Citons comme exemples l'acide kojique et l'helminthosporine (5).



acide kojique



helminthosporine

En conclusion, nous voyons que la chélation intervient dans des phénomènes biologiques fondamentaux comme la respiration et la photosynthèse.

En outre, les chélates peuvent subir une grande variété de réactions comprenant : l'hydrolyse, la transamination, la condensation aldolique, la carboxylation et la décarboxylation (96).

C H A P I T R E I I I

CHELATION ET ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE

I. GENERALITES.

Les chélateurs sont des composés susceptibles de se combiner à des ions métalliques polyvalents qui perdent ainsi toute activité physico-chimique.

Les chélates métalliques ne représentent qu'une subdivision de la série des complexes étudiés par WERNER en 1898, mais il a fallu attendre ces deux dernières décades pour que biologistes et pharmaciens y portent un réel intérêt.

Les atomes donneurs d'électrons sont le plus souvent l'azote, l'oxygène et le soufre, bien que d'autres donneurs soient connus. Ces atomes d'azote, oxygène et soufre font partie de radicaux carboxyle, carbonyle, hydroxyle, amine, ou de fonctions thiol ou thionyl, c'est-à-dire qu'il s'agit comme nous l'avons déjà vu, surtout de groupements appartenant à des acides aminés, aux protéines, et aux molécules essentielles au métabolisme cellulaire. Ces groupements sont résumés

sur le tableau suivant :

Tableau III

Groupements pouvant conduire à la formation d'un complexe			
- <u>par liaison covalente</u> (substitution d'un proton par le métal)			
$R-CO-NH_2$	amide primaire	$R = NH$	imine
$R-CO-NHR$	amide secondaire	$R-SH$	thiol
$R-\underset{\begin{array}{c} \\ O \end{array}}{C}-OH$	carboxyle	$R-SO_2H$	sulfinique
$R-\underset{\begin{array}{c} \downarrow \\ O \end{array}}{N}-H$	oxime	$R-SO_3H$	sulfonique
- <u>par coordinance</u>			
$R=N-OH$	oxime	$R-OH$	alcool ou phénol
$R-NH_2$	amine primaire	$R-S-R$	thio-éther
$R-NH-R$	amine secondaire	$R-O-R$	éther
$R-N=R_2$	amine tertiaire	$R-\underset{\begin{array}{c} \\ S \end{array}}{C}-R$	thionyl
		$R-CO-R$	carbonyl

La mesure des constantes de stabilité est réalisée en général *in vitro*. Toutefois, Schubert (124) a démontré qu'il était nécessaire, dans les milieux biologiques, de tenir compte de plusieurs facteurs propres à l'environnement (tableau IV). Ainsi la présence de cations, principalement le calcium, est susceptible de modifier les valeurs théoriques mesurées dans l'eau distillée. Il s'en suit un nouvel équilibre et une constante efficace de stabilité, parfois inférieure à celle déterminée *in vitro*.

On comprend donc pourquoi l'EDTA, l'agent chélateur le plus utilisé dans les intoxications saturnines ou autres, ne peut mobiliser le mercure dans l'organisme. Le complexe mercuriel de l'EDTA présente pourtant une constante de stabilité très élevée *in vitro*, mais sa constante efficace de stabilité n'est pas supérieure à celle d'autres chélates que le mercure peut former avec des molécules biologiques (20, 25), en particulier les dérivés soufrés (tableau V). Il est donc important de connaître les pharmacocinétiques de l'agent chélateur et du cation métallique (2, 59, 62).

Composés	Log K (eau 20-30° C)					
	Cu ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Co ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Mn ⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺
Glycocolle	8,5	5,2	5,1	4,3	3,2	10
Cystéine	-	9,8	9,3	6,2	4,1	-
Histidine	10	6,7	7	5	4	4,7
Acide glutamique	-	5,4	5,1	4,6	3,3	12,1
Acide ptéroylglutamique	4,4	4,2	4,6	4,5	3,5	-
Riboflavine	7	5,6	3,9	7,1	3,4	-
Hypoxanthine	6,2	-	3,8	3,9	2,4	-
Guanosine	6	4,6	3,2	4,3	-	-
Acide lactique	1,8	2,0	0,9	-	-	6,4

Tableau IV : Pouvoir chélateur de quelques constituants cellulaires.

Les valeurs les plus élevées (histidine - Cu par exemple) ne dépassent pas 10, et il faut noter que tous les agents chélateurs utilisés en thérapeutique donnent des chélates dont les constantes de stabilité sont très supérieures.

Tableau V :

Stabilités relatives des chélates formés par l'EDTA avec divers ions métalliques.

pH = 4,0
$\text{Fe}^{3+} \gg \text{Hg}^{2+} \rangle \text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+} \rangle \text{Pb}^{2+} \rangle \text{Zn}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{Co}^{2+} \rangle \text{Al}^{3+} \rangle \text{Mn}^{2+}, \text{Fe}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+} \rangle \text{Sr}^{2+}$
pH = 7,0
$\text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+} \rangle \text{Fe}^{3+} \rangle \text{Pb}^{2+} \rangle \text{Zn}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{Co}^{2+} \rangle \text{Fe}^{2+} \rangle \text{Mn}^{2+}, \text{Hg}^{2+} \gg \text{Al}^{3+} \rangle \text{Ca}^{2+} \rangle \text{Sr}^{2+}$
pH = 9,0
$\text{Ni}^{2+} \rangle \text{Cu}^{2+} \rangle \text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cd}^{2+} \rangle \text{Pb}^{2+}, \text{Fe}^{3+} \rangle \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+} \rangle \text{Ca}^{2+} \rangle \text{Hg}^{2+} \rangle \text{Sr}^{2+} \rangle \text{Al}^{3+}$

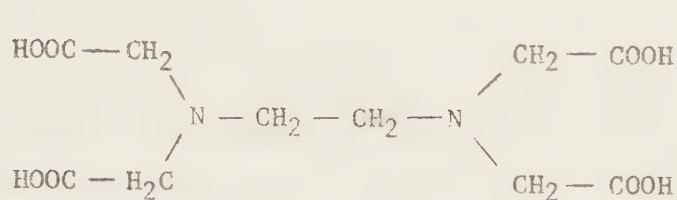
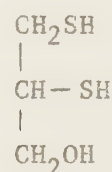
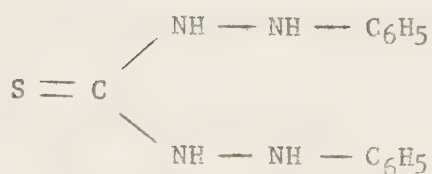
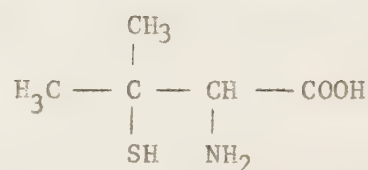
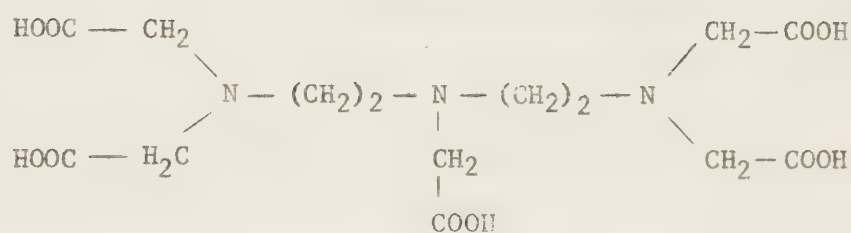
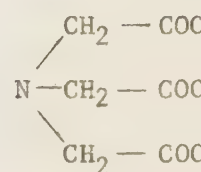
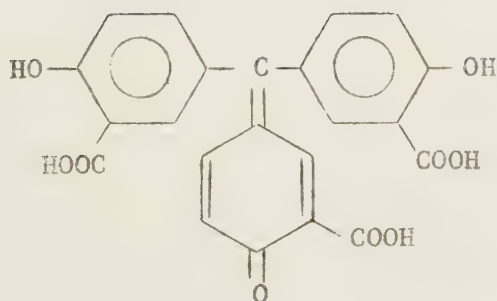
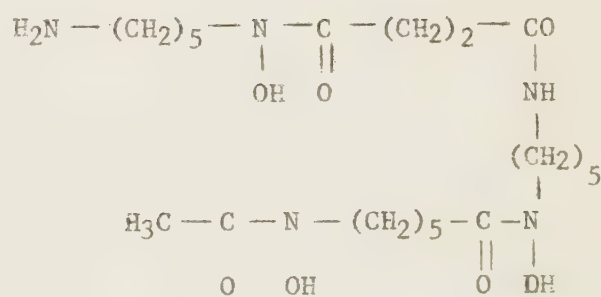
Ces stabilités relatives ont été déterminées dans des conditions physiologiques. Pour cela, on utilise un système aqueux de pH 7,25, contenant des protéines variées et des ions calcium libres à la concentration 10^{-3}M . Cependant, s'il s'agit du sang, de parties infimes d'organes ou de certaines fractions subcellulaires, le pH et les concentrations ioniques et moléculaires peuvent varier considérablement. Néanmoins, le pH est la seule variable utilisée pour évaluer la stabilité d'un chélate *in vivo* et l'état de l'ion métallique lui-même.

II. DIFFERENTES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES.

Les médicaments utilisés à l'heure actuelle pour leurs propriétés chélatrices sont encore en nombre très limité. On les utilise surtout dans les traitements d'intoxications par des métaux, ceux-ci se retrouvant sous une forme solubilisée ultrafiltrable, ce qui augmente leur excrétion urinaire. (Tableau VI).

Tableau VI :

Principaux chélateurs utilisés en thérapeutique.

EDTABALDithizonePénicillamineDTPAAcide nitriloacétiqueAcide aurine tricarboxyliqueDesferrioxamine

Les chélateurs ainsi formés ne sont pas dénués de toxicité. Ainsi sous la forme chélatée, l'aluminium, le mercure et le cuivre se sont avérés plus toxiques qu'à l'état de sels (30). Les chélateurs eux non plus ne sont pas dénués de toxicité à cause de leur manque de sélectivité pour un métal défini. C'est ainsi que le dimercaptopropanol (BAL) inhibe de nombreux métallo enzymes, en particulier la succinodéshydrogénase et les chaînes d'oxydation cellulaire : la cystéamine et la 1-10 phénanthroline exercent un effet du même ordre sur l'anhydrase carbonique rénale (24). Par ailleurs, on s'est rendu compte que bien des médicaments agissent, semble-t-il, par un mécanisme de chélation.

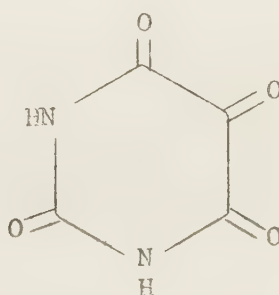
1) Action diabétogénique :

Un certain nombre de molécules organiques simples sont capables d'induire un syndrome typique de diabète dans des conditions convenables d'expérimentation. Plusieurs de ces molécules sont de puissants agents chélateurs.

C'est le cas de la diphényldithiocarbazone ou dithizone (30), qui provoque des lésions des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas un ou deux jours après l'administration de 50 à 150 mg/kg. Le taux de zinc du sérum des animaux augmente, de même que l'excrétion urinaire de ce métal.

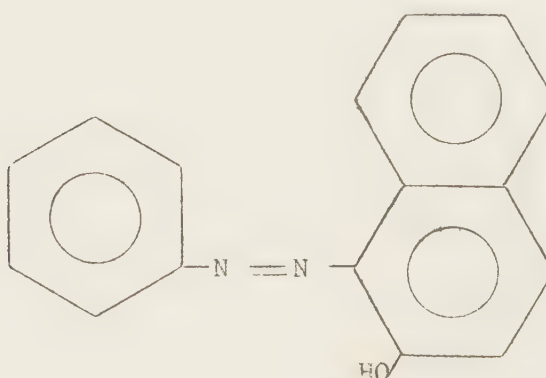
La 8-hydroxyquinoléine a la même action, surtout chez le lapin. On peut créer un diabète expérimental en injectant à l'animal une dose convenable d'alloxane ou mésoxalylurée.

On pense que l'alloxane exerce dans un premier temps un effet chélateur sur le zinc et libère l'insuline.



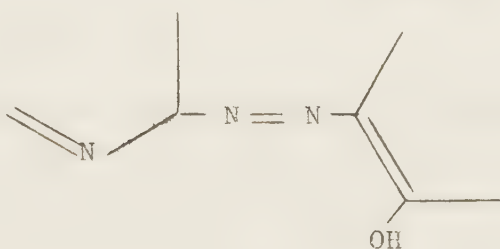
alloxane

On a recherché d'autres chélateurs susceptibles de présenter une affinité spécifique pour le zinc. Les recherches ont porté sur le 2-pyridyl 2' azonaphtol dont le chélate de zinc (1:1) est particulièrement stable en présence d'autres cations ; le complexe est doué de propriétés hypoglycémiantes très marquées.



2-pyridyl 2' azonaphtol

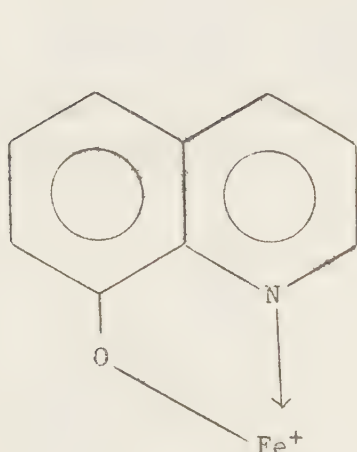
Les dérivés apparentés qui donnent des structures stables avec le zinc possèdent l'enchaînement suivant :



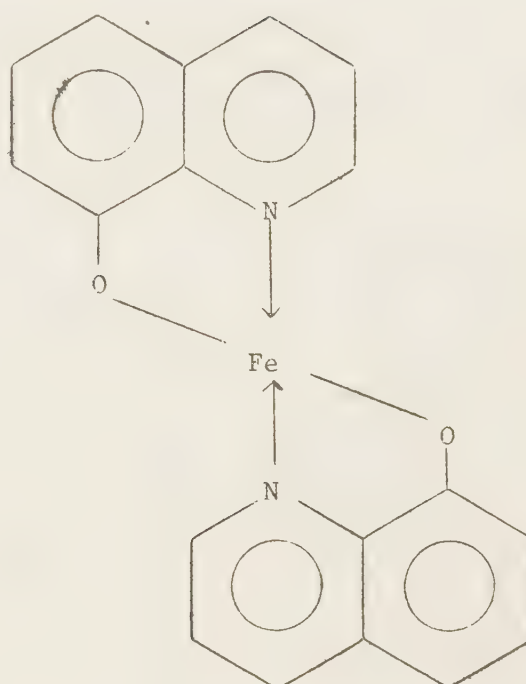
2) Activité antibactérienne :

A) La 8 hydroxyquinoléine ou oxine en présence de fer s'est avérée être un puissant antiseptique. En l'absence de fer, on

n'observe aucune activité bactéricide.



Complexe 1:1

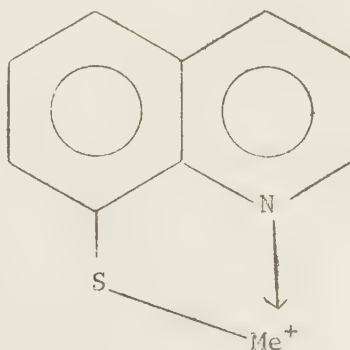


Complexe 2:1

C'est le complexe soluble 2:1 qui pénètre dans la membrane cellulaire, alors que la toxicité est due au complexe 1:1.

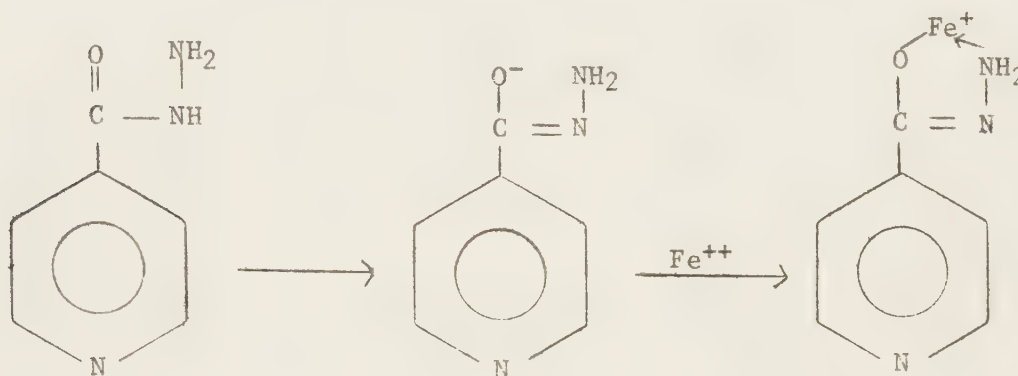
Il existe un rapport optimal entre la 8-hydroxyquinoléine et le fer pour qu'on observe un effet bactéricide. En effet, un excès de fer est moins bénéfique (29).

La 8-hydroxyquinoléine forme des précipités avec une variété de métaux lourds. Les composés de structure voisine n'ont pas d'effet bactéricide (49). Par contre, la 8 mercapto-quinoléine est fortement bactériostatique.



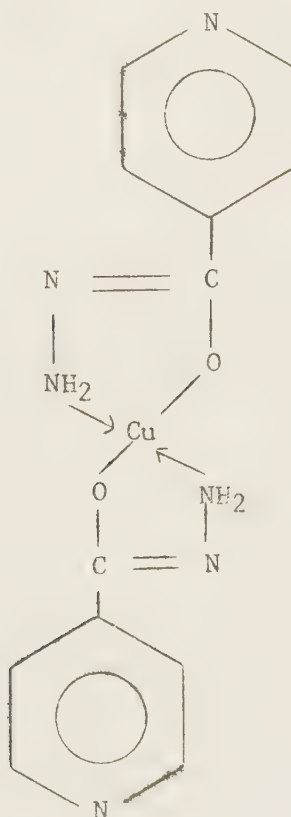
Complexe 1:1

B) L'activité tuberculostatique de l'isoniazide doit être rapportée aussi à son pouvoir chélateur. En présence d'un excès de fer, il y a perte d'activité. Le dérivé méthylé de l'isoniazide est inactif sur la bacille de Koch, et n'a pas de pouvoir chélateur. D'autres médicaments antituberculeux sont doués de propriétés chélatrices, comme l'éthambutol.

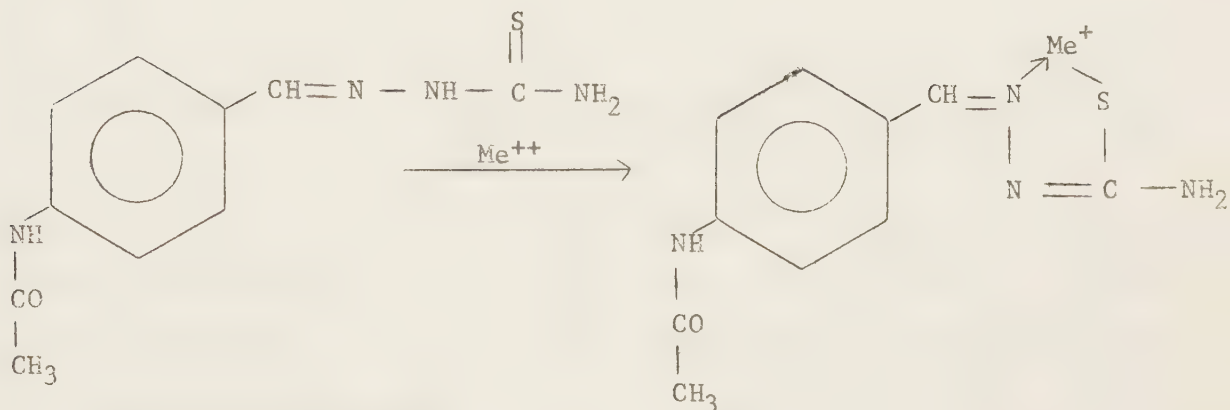
Isoniazide

anion

In vitro, l'isoniazide a une activité tuberculostatique plus marquée lorsque la teneur du milieu en cuivre est elle-même augmentée (9).

Complexe 2:1

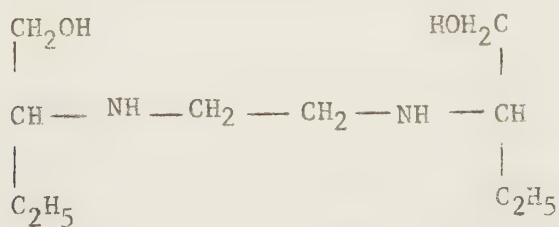
La thiacétazone est utilisée pour les infections résistantes à l'isoniazide.



Thiacétazone

C) L'éthambutol :

L'éthambutol chélate de la même façon que l'éthylène diamine. Il peut être considéré comme une version de ce dernier plus lipophile et d'encombrement stérique plus important.



D) Certains antibiotiques ont des activités chélatrices (30)
(tableau VII).

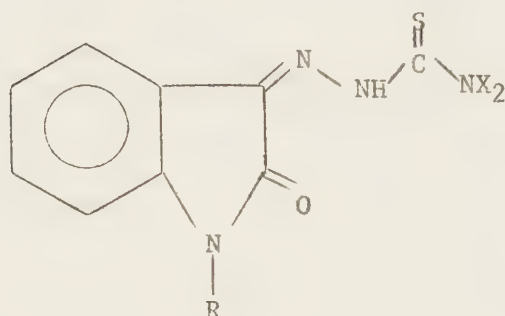
Tableau VII :

Composés	Pouvoir chéla- teur	Cations modifiant l'activité biologique	Log K		
			Cu ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺
8-hydroxyquinoléine	+	Fe, Cu, Co, Zn	12,2	-	12,3
acide salicylique	+	Fe, Cu, Co, Zn	10,6	6,9	16,4
acide paraaminosalicylique	+	Fe, Cu	9,7	-	16,1
hydrazide isonicotinique	+	Fe, Cu, Mn, Co	8,0	5,4	-
Streptomycine	+	Mn	-	-	-
Tétracycline	+	Fe, Mn, Mo, Al	7,8	4,9	9,9
Chlortétracycline	+	Fe, Cu, Co, Zn	7,6	4,5	9,4
Oxytétracycline	+	Fe, Cu, Co, Zn	7,2	4,6	9,6
Pénicillines	?	Co	-	-	-
Chloramphénicol	-	-	-	-	-
Erythromycine	-	-	-	-	-

Les tétracyclines chélatent tous les métaux lourds et sont inactives par ceux-ci aux fortes concentrations (15). Elles peuvent en particulier être inactivées par les ions calcium, magnésium, ferrique. Il y a en effet formation de complexes mal résorbés dans l'intestin (38).

3) Activité antivirale :

Parmi les très rares antiviraux connus, les thiosemicarbazones occupent une place de choix. Comme la thiacetazone, ils forment rapidement des complexes métalliques du même type.



R = H X = H

activité antivariolique

R = CH₃ X = Bu

activité antipolyomyélitique

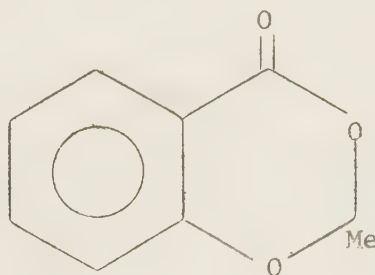
4) Activité angioprotectrice :

Après l'étude de l'activité angioprotectrice d'une série de flavonoïdes sur la réponse à l'adrénaline d'un intestin isolé de lapin, Clark et Geissman (131) ont conclu que la potentialisation de l'action de l'adrénaline provoquée par ces composés était directement liée à la stabilité et à l'insolubilité des chélates cuivriques formés. Ils ajoutent 1 µg/ml de sulfate de cuivre au milieu pour uniformiser la concentration en métal et augmenter la reproductibilité de leurs résultats. Cela élimine aussi la potentialisation observée.

Parmi ces composés, on distingue ceux qui rentrent dans le groupe de la quercétine. Les composés les moins solubles sont les plus actifs.

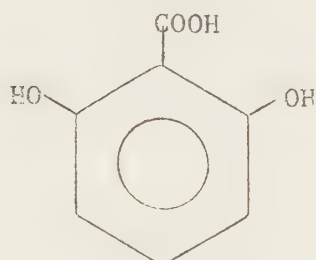
5) Activité antipyrétique :

Les chélates métalliques de l'acide salicylique sont bien connus. Son action pharmacologique serait en relation avec cette propriété (9).



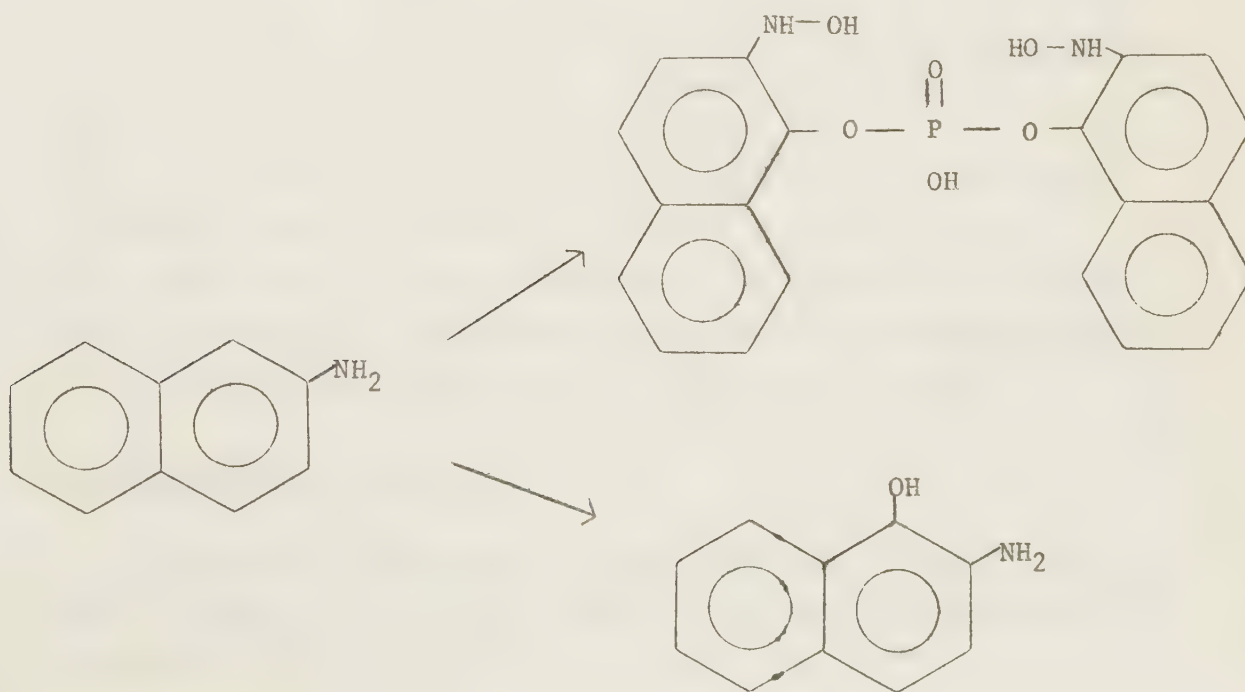
Les isomères méta et para sont dépourvus de propriétés chélatrices.

L'acide γ -résorcylique chélate à un plus haut degré, environ dix fois plus que l'acide salicylique.



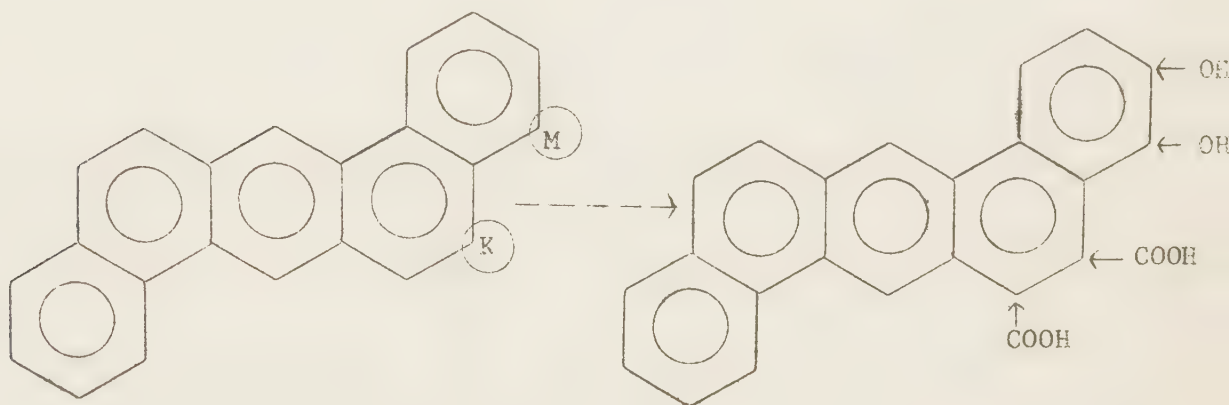
6) Activité carcinogénique :

De récentes études ont montré que la β naphthylamine est métabolisée en un dérivé qui est un chélateur puissant, responsable de cancers vésicaux. Ce dérivé est l'amino-2-naphtol. Il peut se transformer aussi en di-(2 hydroxylamino-1-naphtyl)-phosphate, isolé dans l'urine par Troll et al. (140) qui est aussi un chélateur actif.



β naphthylamine

Les travaux de Pullman (112) ont mis l'accent sur la structure particulière des hydrocarbures polycycliques cancérigènes comme le dibenzanthracène. Il existe une "région K" active et c'est à son niveau que seront créés par un processus oxydatif des groupements favorables à l'activité complexante. Puis il s'effectuerait des transformations métaboliques sur les positions voisines d'une "région M". On obtient alors un agent chélateur qui va favoriser la pénétration des métaux lourds à l'intérieur des cellules.



Dibenzanthracène

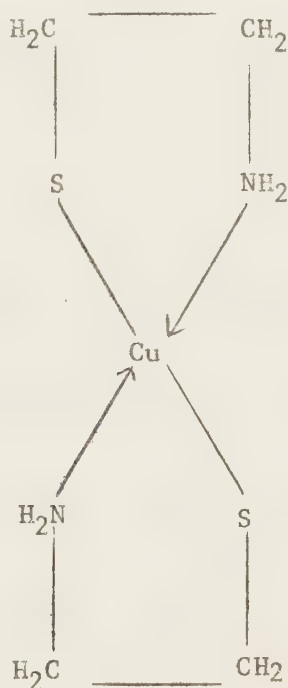
Plusieurs antimétabolites sont également des agents chélateurs. Des chélates se sont révélés actifs non seulement sur la production des tumeurs, mais aussi sur la guérison de quelques tumeurs expérimentales :

- Les chélates de la riboflavine-5' phosphate sont actifs sur le carcinoma provoqué chez le rat par le benzopyrène.
- Les chlorophyllines cuivriques sur la tumeur ascitique d'Ehrlich.
- Le chélate diméthylglyoxime-cuivre sur le sarcome de Crocker.
- Les porphyrines se lient sélectivement à des tumeurs et on a proposé leur utilisation dans la thérapeutique cancéreuse. Un analogue de l'hème a été synthétisé dans lequel un atome d'uranium est complexé.

7) Activité radioprotectrice :

Différents produits ont été présentés comme possédant des propriétés protectrices contre les effets biologiques des radiations ioniques (tableau VIII).

Les amino-thiols et leurs dérivés sont parmi les plus actifs. C'est le cas de la cystéamine ou mercaptoéthylamine dans laquelle les deux groupements -NH_2 et -SH sont séparés par un pont éthylénique.



Complexe cuivrique de la cystéamine.

L'aminoéthyl-isothiouronium (AET) ne possède pas de fonction thiol et doit se transformer *in vivo* en mercaptoéthylguanidine (MEG) qui est un puissant chélateur (9).

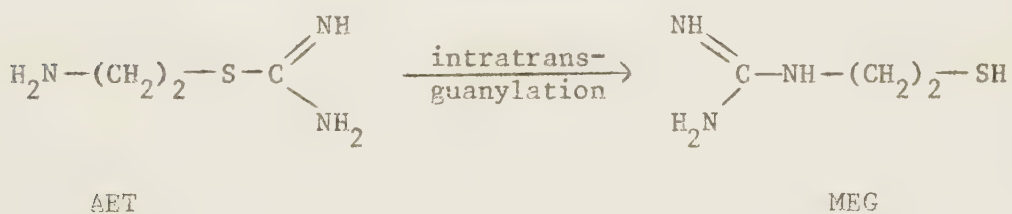


Tableau VIII :

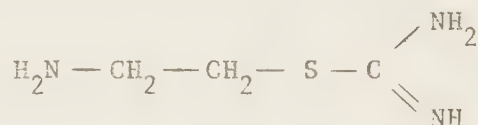
Composés radioprotecteurs.

Cyanures et nitriles CN^-

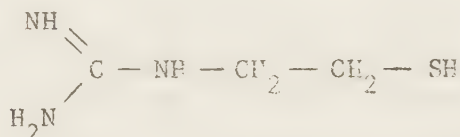
Aminothiols :

Cystéamine $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SH}$ Cystamine $\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_2 - \text{S} - \text{S} - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH}_2$

Aminoéthyl-isothiouronium : AET



Mercaptoéthylguanidine : MEG

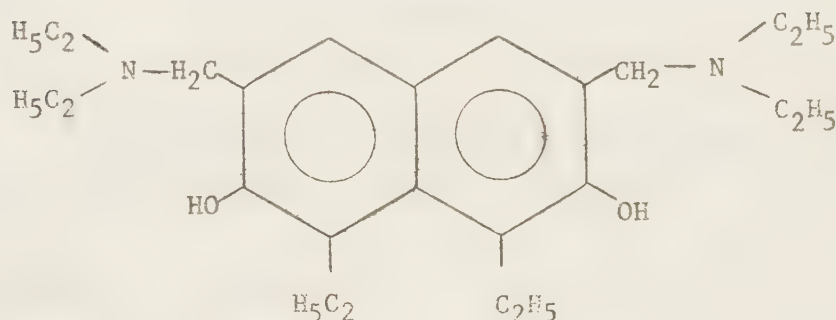


5 OH tryptamine = sérotonine

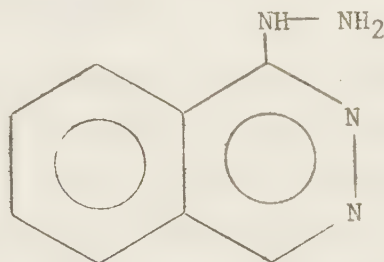
Paraaminopropiophénone

8) Activités diverses :A) Le biallylamicol :

Il est utilisé dans le traitement de la dysenterie amibienne et est un agent chélateur de type O,N, comme la glycine. Le mécanisme d'action exact est inconnu.

B) L'hydrallazine :

C'est un agent hypotenseur très puissant. On pense qu'il agit par chélation de métaux qui sont des co-facteurs d'enzymes de décarboxylation, particulièrement la tyrosine décarboxylase, qui donne la tyramine.

C) Thiourée - Thiouracile :

Le thiourée et le thiouracile ont essentiellement le même effet qualitatif sur la glande thyroïde et sont capables de chélater le cuivre (9).

Certains chélates argentiques des dérivés de l'uracile ont des propriétés antibactériennes *in vitro* (159).

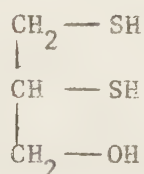
C H A P I T R E I V

MONOGRAPHIES

I. B.A.L : British anti-lewisite
 Dimercapto-propanol, dimercaprol.

C'est un détoxifiant thérapeutique utilisé dans les intoxications par les arsenicaux, le mercure et l'or.

1) Structure : $C_3H_8OS_2$



P.M. 124, 21

2) Propriétés physico-chimiques :

C'est un liquide clair, incolore, visqueux, d'odeur désagréable caractéristique, soluble à 7 % dans l'eau, soluble dans les huiles végétales, l'alcool et autres solvants organiques.

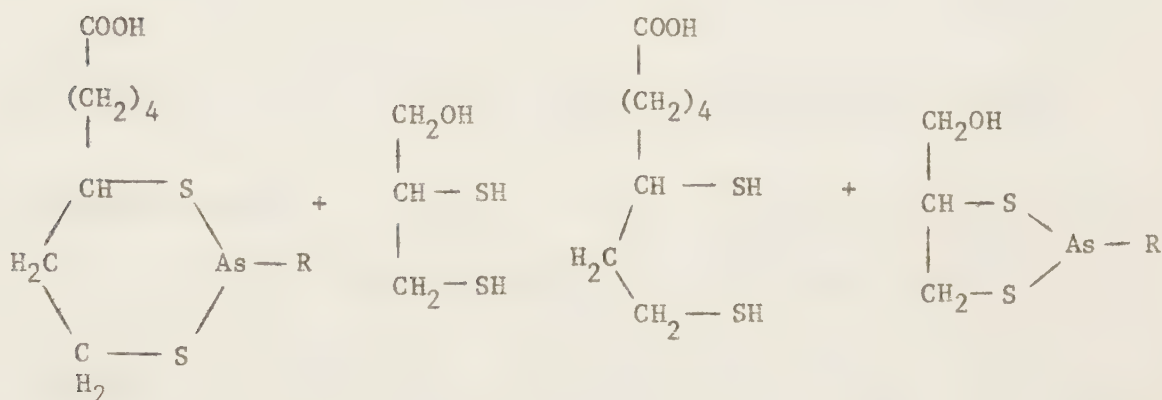
Il forme des chélates faiblement dissociés avec une variété de métaux. Cependant avec le mercure et le cadmium, le chélate 1:1 peut réagir avec une deuxième molécule de dimercaprol pour donner un complexe 2:1 moins dissociable que le premier.

3) Mécanisme d'action :

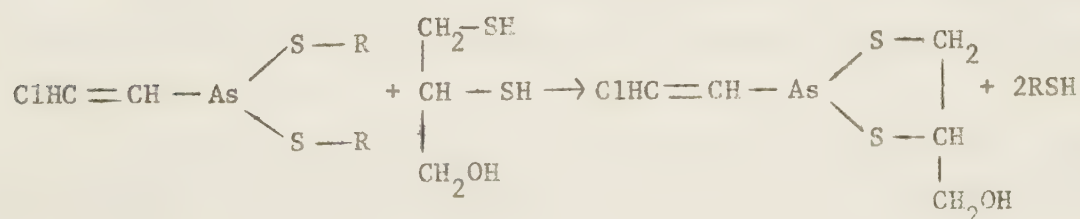
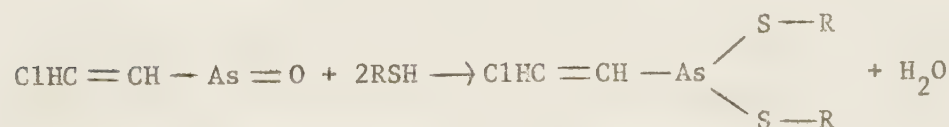
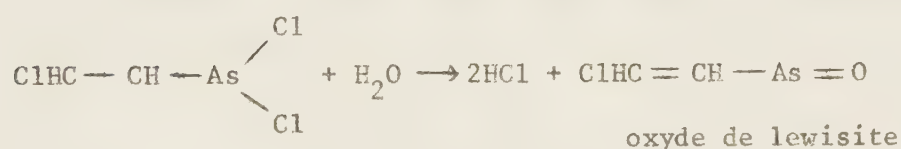
Le BAL ne protège pas seulement les enzymes à groupement -SH de l'inactivation par les métaux lourds, mais il réactive aussi les systèmes enzymatiques déjà inhibés, ce qui se passe pour le dihydro-

lipoate inhibé par l'arsenic.

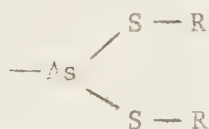
Les arsenicaux forment un cycle hexagonal avec le dihydro-
lipoate, mais le cycle pentagonal formé avec le BAL est plus stable.



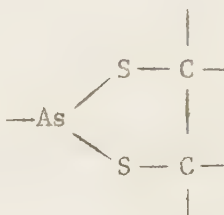
Le BAL doit son nom à son utilisation pendant la première guerre mondiale, comme antidote de la lewisite. Cette dernière était utilisée comme gaz de combat. Elle possède dans sa formule un atome d'arsenic qui bloque les groupements thiols.



La solution est donc d'arracher l'arsenic fixé aux protides sous la forme



en l'engageant dans un cycle pentagonal plus stable



Ce cycle est plus soluble dans l'eau et s'élimine dans les urines.

4) Pharmacologie :

Le BAL est rapidement oxydé dans l'organisme. Pour cette raison, un complexe dimercaprol-métal qui se dissocie peut voir le dimercaprol s'oxyder et libérer le métal qui se trouve ainsi sous sa forme active (86). Il faut donc toujours maintenir un léger excès de dimercaprol.

5) Toxicité et effets secondaires :

Des réactions apparaissent chez 50 % des sujets recevant 5 mg/kg par voie intramusculaire (86).

Le BAL pourrait affecter la fonction thyroïdienne (38, 61) et est capable d'affecter directement un certain nombre d'enzymes :

Enzymes solubles : un certain nombre de métalloenzymes sont inhibés, probablement par extraction du métal (152).

Hexokinase (Mg)

Polyphenoloxydase (Cu)

Il y a aussi inhibition de l'anhydrase carbonique, la catalase, la peroxydase, la phosphorylase, et l'aldéhyde oxydase (42, 74, 111).

Enzymes particulières : Dans les mitochondries, le BAL inhibe l'activité de la cytochrome oxydase, de la pyruvate oxydase et de la succinoxydase (156).

On a découvert récemment que le complexe formé entre le BAL et l'arsenic inhibe plus certains systèmes particuliers que le BAL

ou l'arsenic seuls. Ce complexe bloque l'oxydation du NADH_2 , les phosphorylations oxydatives, l'ATP-ase sensible au dinitrophénol et l'échange ATP-Pi dans les mitochondries (56,70), l'ATP-ase de la myosine du muscle (57) et l'ATP-ase microsomiale Na^+/K^+ dépendante (132).

La DL_{50} est de 105 mg/kg en intramusculaire chez le rat.

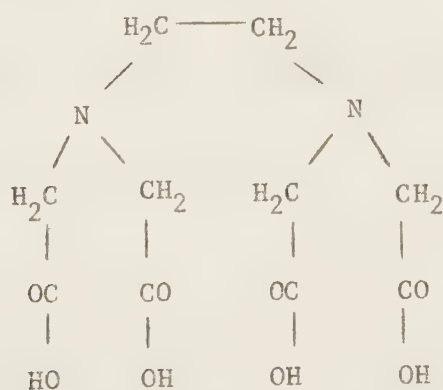
6) Absorption, Distribution, Excrétion :

Après une injection intramusculaire d'une solution à 10 % de BAL dans l'huile, la plus forte concentration sanguine est atteinte en trente minutes, l'absorption et la détoxication étant terminées en quatre heures.

Chez l'animal, il y a une augmentation sensible de l'excrétion de soufre neutre dans l'urine, correspondant à 50 % environ du soufre injecté dans le BAL (86).

II. E. D. T. A : acide éthylène diamine tétraacétique.

1) Structure : $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$



P.M. : 292,24

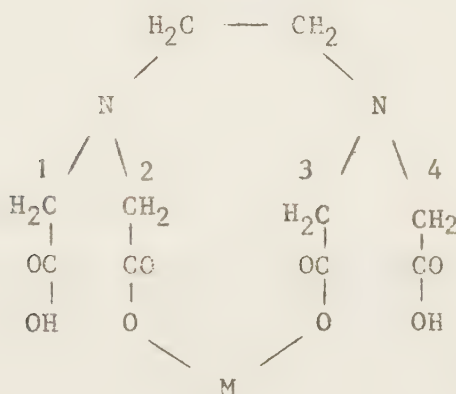
Le sel disodique a un poids moléculaire de 372,24.

2) Propriétés physico-chimiques :

C'est une poudre cristalline blanche, peu soluble dans l'eau : 0,5 g/l à 25° C. Le sel disodique est plus soluble à 25° C.

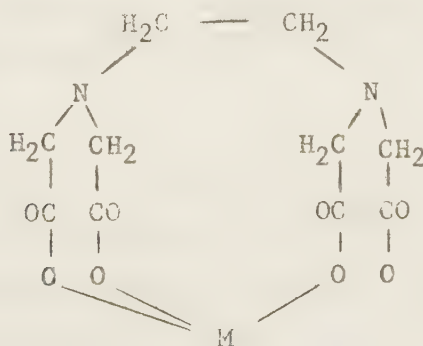
Très utilisé dans l'industrie et comme réactif en chimie analytique, l'EDTA forme des chélates faiblement dissociés avec plusieurs métaux au moins bivalents : plomb, calcium, mercure (19), zinc (90).

Avec un métal bivalent, la formule du composé est :

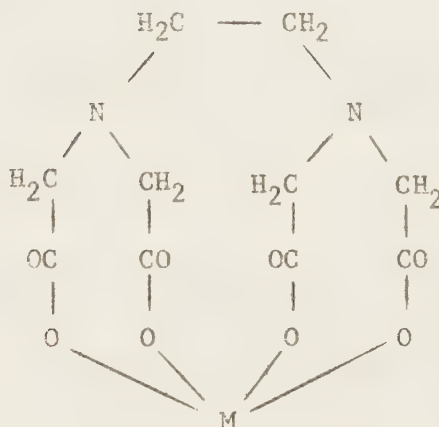


Dans le calcitétracémate disodique, les groupements OH 1 et 4 sont remplacés par -ONa, et M par le calcium.

Pour un métal trivalent, la formule sera :



Et pour un métal tétravalent :



3) Pharmacologie :

Une injection d'EDTA sous forme de calcitétracémate entraîne la chélation de métaux ayant une affinité plus grande pour l'EDTA que le calcium. On ne risque pas ainsi d'accidents d'hypocalcémie.

Dans l'ordre, il chélatera :

le plomb, le mercure, le calcium, le zinc (108).

L'administration d'EDTA accroît énormément l'excrétion urinaire du zinc (108). Au contraire, elle répond beaucoup moins à une intoxication par le mercure.

Le sel disodique de l'EDTA est utilisé pour capter le calcium dans les hypercalcémies.

4) Toxicité :

Elle se manifeste surtout sur le rein (129). A fortes doses, on observe une destruction tubulaire avec dégénérescence du tube proximal, ce qui provoque une albuminurie. La DL₅₀ chez la souris est de 20,5 mg/kg par voie orale et de 2,6 mg/kg par voie intrapéritonéale.

Effet sur la biosynthèse de l'ADN :

L'influence du calcitétracémate sur la biosynthèse de l'ADN dans les cryptes intestinales du rat a été étudiée (18). Les résultats ont permis de conclure qu'une réaction précédant la synthèse de l'ADN est inhibée par la chélation du zinc, du manganèse ou du fer.

Effet sur la coagulation :

L'EDTA prolonge le temps de prothrombine. Certains auteurs ont montré que cet effet n'est pas dû à la chélation du calcium ou du magnésium, mais à la chélation du nickel qui stabilise le facteur labile (15).

Effet sur les lysosomes :

Le calcitétracémate disodique rend labile la membrane des lysosomes. Il en résulte la dégradation du collagène avec une augmentation de l'hydroxyproline urinaire (120, 121).

5) Métabolisme :

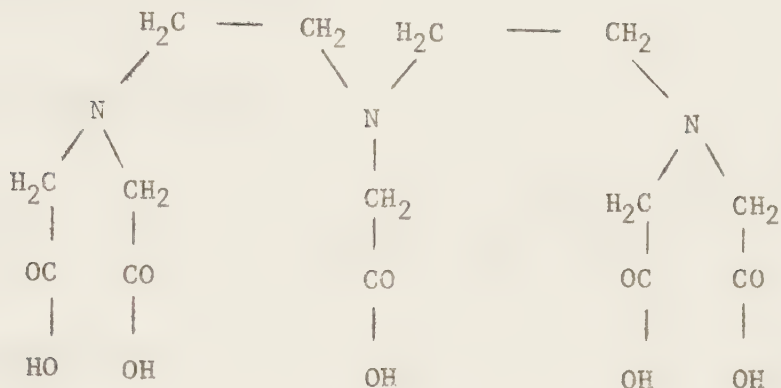
L'EDTA est faiblement absorbé dans le tube digestif de l'homme ou de l'animal (58, 60). Ceci est confirmé par le fait que son administration orale n'augmente pas l'excrétion urinaire du calcium (134).

Après une administration intraveineuse, il disparaît de façon exponentielle de la circulation et est rapidement excrété dans l'urine. Sa demi-vie biologique chez l'homme est de 60 minutes environ.

III. D.T.P.A. : acide diéthylènetriaminepentaacétique.

C'est un polyaminoacide de structure similaire à l'EDTA. Il a une plus grande affinité pour la plupart des métaux lourds.

1) Structure : $C_{14}H_{23}N_3O_{10}$



P.M. : 393,35.

Il est surtout utilisé dans les intoxications par les métaux radio-actifs.

2) Métabolisme :

Utilisé sous la forme de $CaNa_2DTPA$, le DTPA est rapidement excrété dans l'urine :

30 à 40 % en deux heures

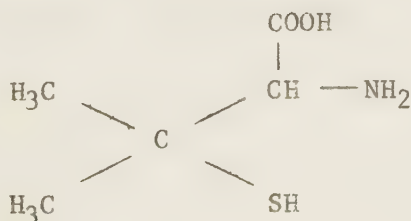
50 à 70 % en quatre heures

90 à 100 % en trente-quatre heures.

On le retrouve surtout dans le foie, le rein et les espaces extracellulaires.

IV. PENICILLAMINE.. - $\beta\beta$ diméthylcystéine
- D_3 mercaptovaline

1) Structure : $C_5H_{11}O_2NS$



P.M. : 149,21.

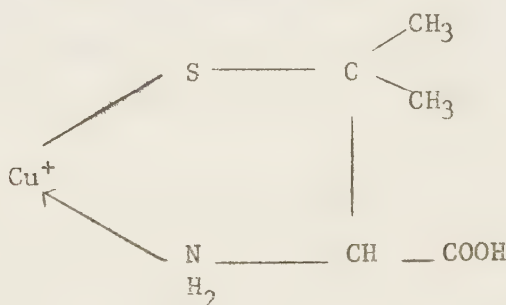
La proximité des groupes $-SH$ et $-NH_2$ fait de la pénicillamine un bon agent de chélation du cuivre, du mercure, du plomb.

2) Propriétés physiques :

C'est une poudre blanche cristalline, soluble dans l'eau, l'éthanol, insoluble dans l'éther ; en solution aqueuse, elle est très stable à pH 2 à 4, et est active par voie orale.

3) Pharmacologie :

Chélateur puissant du cuivre, du mercure et du plomb, la pénicillamine accroît l'excrétion urinaire de ces métaux.

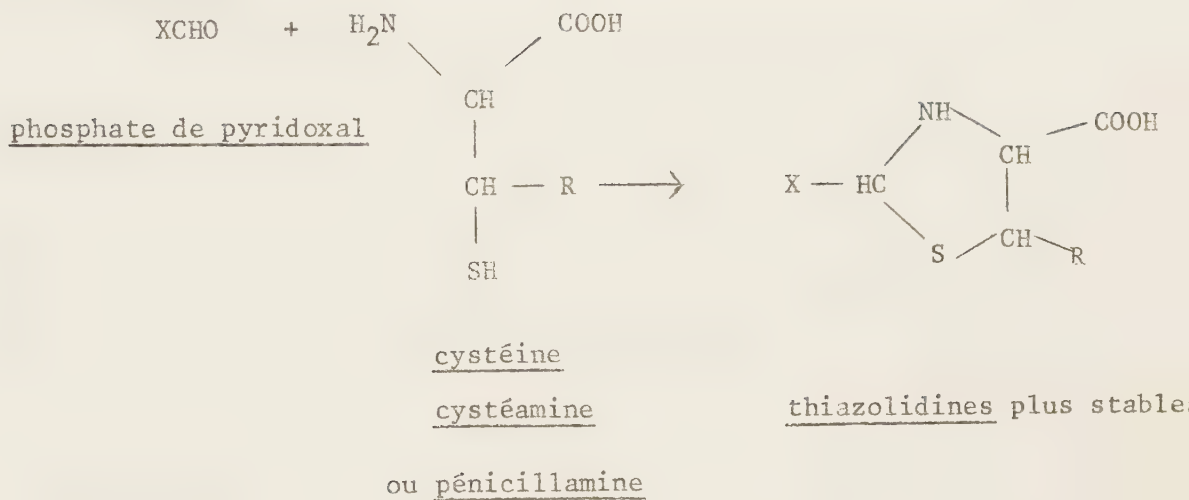


Complexe cuivrique 1:1 (67)

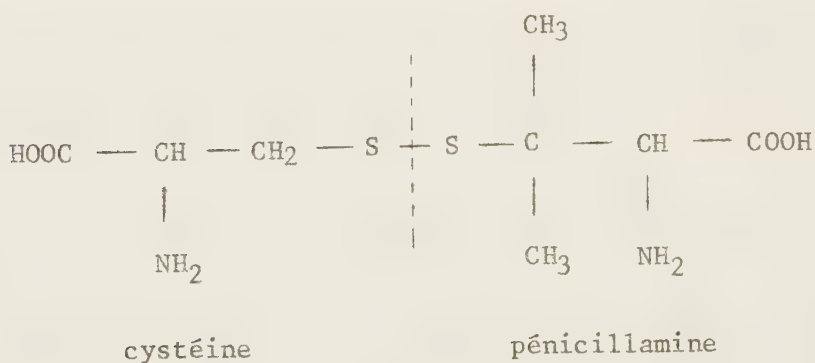
4) Toxicité :

La pénicillamine inhibe la transaminase, la cystéine désulfhydrase et la synthèse de l'acide d-aminolévulinique, substances toutes pyridoxal dépendantes (7). Expérimentalement, les effets toxiques chez des rats ayant reçu une forte dose de pénicillamine ressemblent à ceux que l'on constate lors d'une carence en vitamine B6. Ces effets sont annulés si on ajoute la pyridoxine (8,71).

La cystéine et la cystéamine ont le même effet (39).

Mécanisme :

L'administration de la pénicillamine à des patients présentant une cystinurie conduit à une diminution de l'excrétion urinaire de la cystine et son remplacement par le disulfure mixte : (36,37)



Le résultat net est l'augmentation de l'excrétion des résidus cystéinyl (80, 109).

Inhibition de la synthèse du collagène : (101, 145)

Le défaut de synthèse du collagène est démontré par le fait qu'il y a une forte augmentation de la quantité de collagène soluble extractable par un sel ou un acide (40, 102).

5) Métabolisme :

La pénicillamine est bien absorbée par le tractus gastro-intestinal et, pour cela, a un avantage décisif sur les agents chélateurs précédemment cités. Mais elle est rapidement excrétée dans l'urine. Elle est relativement stable *in vivo*, par rapport à la cystéine. La N-acétyl-pénicillamine est plus active que la pénicillamine dans la protection contre les effets toxiques du mercure, car elle est plus résistante à la dégradation métabolique.

V. DEFERRIOXAMINE.

C'est un chélateur du fer, isolé à partir d'un milieu de culture de *Streptomyces pilosus* (16) qui produit la ferrioxamine. On enlève chimiquement le fer trivalent et on obtient la desferrioxamine.

P.M. 560,71.

C'est une poudre soluble dans l'eau. Théoriquement, la molécule peut contenir 9 % de son poids en fer ferrique, et le complexe est remarquablement stable à pH 7. (6,125,126).

In vitro, la desferrioxamine déplace le fer de la transferrine, de l'hémossidérine et de la ferritine.

Bannerman et al (11) ont démontré sa spécificité marquée pour le fer et en ont proposé l'utilisation dans les cas de surcharge en fer.

VI. ACIDE AURINE TRICARBOXYLIQUE : ATA

On a établi très tôt la valeur de l'ATA comme un antidote à l'intoxication aigue au béryllium.

VII. ACIDES HYDROXAMIQUES :

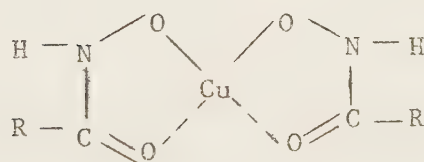
Ce sont des agents chélateurs qui ont été très étudiés (47 , 52 , 64).

Structure :

Les acides hydroxamiques existent sous deux formes tautomères :



Structure du complexe cuivrique (35) :



Expérimentalement, une activité protectrice envers des intoxications par le mercure a été recherchée (52). Notre travail s'inscrit à la suite de ces recherches. Nous en reparlerons dans la partie expérimentale.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES EXPERIMENTALES

C H A P I T R E I

ACTIVITES PROTECTRICES COMPAREES

de 1'ACIDE CHROMONE CARBOHYDROXAMIQUE -2 (SEL SODIQUE),
de 1'ACIDE CHROMONE CARBOXYLIQUE -2, de la METHIONINE,
de 1'EDTA et de la PENICILLAMINE.

Les travaux précédemment effectués (52) ont montré que 1'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) possède une activité protectrice très nette vis-à-vis de 1'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris, puisque le pourcentage de mortalité est très abaissé par rapport à celui des témoins. Cette activité protectrice augmente avec la dose utilisée, et 1'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) a, par le test considéré une activité sensiblement voisine de celle présentée par la méthionine et le tétracémate disodique, sinon supérieure.

Quant à 1'acide chromone carboxylique -2, il présente une légère activité.

Nous avons complété cette étude en recherchant une activité protectrice de la Pénicillamine, chélateur puissant formant des complexes très stables avec les ions mercuriques (153).

I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Le protocole expérimental consiste à apprécier, par calcul du pourcentage de mortalité, le degré de protection exercé par les substances à tester vis-à-vis de 1'intoxication au chlorure mercurique administré par sonde oesophagienne chez la Souris. Pour chaque

dose expérimentale, il est utilisé des lots homogènes de 10 souris albinos IFFA (OF₁) des deux sexes pesant environ 20 g. Les produits à tester sont utilisés en solution aqueuse et administrés par voie orale à raison de 0,5 ml par animal. Il est procédé à une double administration : 24 h et 15 minutes avant le début de l'intoxication au chlorure mercurique. Cette dernière est réalisée par intubation de chlorure mercurique par sonde oesophagienne à la dose de 150 mg/kg de poids corporel. L'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique), l'acide chromone carboxylique -2, la méthionine et le tétracémate disodique ont été administrés chaque fois *per os* aux doses respectives de 100, 200, 400 mg/kg, doses qui sont inférieures aux DL₀ de ces substances. Pour la pénicillamine, l'étude a été élargie à la dose de 50 mg/kg, sur les résultats très marqués obtenus avec cette substance.

Les animaux sont alors isolés et observés pendant 48 heures : le nombre de morts est noté au bout de 3, 5, 24 et 48 heures.

Nous n'avons pas jugé nécessaire de prolonger l'observation au-delà de 48 heures car la dose utilisée correspondait chez les témoins à une mortalité voisine de 100 p. 100 au bout de ce temps-là. L'effet protecteur des substances testées est alors plus significatif.

II. RESULTATS OBTENUS.

Les résultats obtenus pour la Pénicillamine figurent sur le tableau IX. Nous avons rappelé les résultats précédemment obtenus pour les autres dérivés étudiés.

Tableau IX : Pourcentage de mortalité après intoxication au chlorure mercurique dans les divers lots expérimentaux.

Lots	Doses mg/kg	Mortalité p. 100 aux temps considérés après le chlorure mercurique				
		Moyennes	3 h	5 h	24 h	48 h
Témoins	0	M α	13,3 8,6	23,3 10,6	81,6 9,1	93,3 6,9
Traités Pénicillamine	50	M α	0 0	3,3 3,4	26,6 7,0	45,0 4,5
	100	M α	0 0	0 0	4,3 8,3	21,4 14,3
	200	M α	0 0	0 0	1,6 3,3	20,0 9,0
	400	M α	0 0	0 0	0 0	0 0
Traités acide chromone carbo- hydroxamique -2 (sel sodique)	100	M α	13,3 4,2	16,6 5,5	53,3 6,6	71,6 7,3
	200	M α	10,0 7,0	16,0 5,2	32,0 8,0	40,0 8,2
	400	M α	1,6 2,0	8,3 2,4	16,6 4,7	28,3 3,2
Traités Méthionine	100	M α	4,3 3,7	13,5 6,8	43,4 5,2	58,8 7,7
	200	M α	4,1 4,8	12,7 5,9	36,0 9,0	50,0 8,2
	400	M α	2,4 2,8	5,5 4,5	13,0 6,5	32,7 12,7
Traités Tétracémate disodique	100	M α	1,1 1,7	5,5 3,0	24,4 5,9	36,6 6,8
	200	M α	0,9 1,3	1,8 3,2	20,9 8,6	38,2 11,5
	400	M α	1,0 1,5	4,0 3,6	25,0 10,1	41,0 10,9
Traités acide chromone carboxylique -2	100	M α	8,8 5,6	11,1 3,5	38,3 6,7	58,8 7,2
	200	M α	7,5 6,5	13,5 5,2	42,5 7,1	62,5 5,8
	400	M α	10,8 8,5	17,5 7,8	55,0 7,6	65,0 4,5

Nous voyons ainsi que la Pénicillamine protège très efficacement les animaux. A faible dose (50 mg/kg), elle possède déjà une activité significative. A la dose de 400 mg/kg, la protection semble totale.

.

III. CONCLUSION.

Tous les dérivés utilisés présentent une certaine activité protectrice vis-à-vis de l'intoxication au chlorure mercurique. Le moins actif est l'acide chromone carboxylique -2, le plus actif la pénicillamine. L'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique), la méthionine et l'EDTA ont des activités sensiblement voisines.

C H A P I T R E I I

ACTIVITES PROTECTRICES COMPAREES

VIS-A-VIS DE L'INHIBITION MERCURIQUE de la LDH *in vitro*.

Le chlorure mercurique provoque une inhibition de la lactate déshydrogénase (LDH). La LDH contient de nombreuses fonctions thiols en particulier des résidus de cystéine qui sont un élément important des sites actifs ou catalytiques de nombreux enzymes (89).

Le chlorure mercurique inhibe donc la LDH. Cette inhibition est de type non compétitif (72, 136).

Il est probable que le chlorure mercurique se combine réversiblement avec les groupements thiols de l'enzyme. Les travaux précédemment effectués ont d'ailleurs montré que l'inhibition mercurique de la LDH était plus ou moins levée par les différents produits étudiés. Comme dans le chapitre précédent, nous avons élargi cette étude à celle de la pénicillamine.

I. ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA LDH.

La LDH catalyse la réaction :



Nous avons utilisé la technique de CABAUD et WROBLEWSKI (23) décrite par BASTIDE, BAUDON, DASTUGUE, REBIERE (14).

Principe :

A pH 7,8, la LDH transforme en présence de $\text{NADH} + \text{H}^+$ le pyruvate en lactate et NAD^+ . Le pyruvate restant réagit avec la

2-4 dinitro-phénylhydrazine pour former une hydrazone colorée, appréciée à 400-500 nanomètres en milieu sodique. Les autres composés sont incolores.

II. CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Nous avons pris la dose de chlorure mercurique qui provoque une inhibition presque maximale de l'enzyme, et avons essayé de lever cette inhibition par des doses croissantes de Pénicillamine.

Réactifs utilisés :

*Tampon phosphate à pH = 7,8 (Soerensen)

Solution A = $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ M/15 à 9,078 g/l.

Solution B = PO_4HNa_2 , 12 H_2O M/15 à 23,870 g/l.

Mélanger 91,5 ml de B et 8,5 ml de A pour obtenir 100 ml de tampon.
Vérifier le pH.

*Solution de pyruvate de Na à 220 mg/l soit 0,002 M.

Faire la solution dans le tampon, soit 22 mg de pyruvate dans 100 ml de tampon.

*Solution de Nicotinamide adénine dinucléotide réduit à 10 mg pour 1 ml d'eau distillée. Cette solution ne se conserve pas et est à préparer extemporanément en la maintenant dans un bain de glace.

*Solution de soude 0,4 N (16 g/l).

*Solution de 2-4 dinitro-phénylhydrazine (2-4 DNPH) :

2-4 DNPH : 200 mg

HCl concentré : 85 ml

H_2O distillée qsp 1 litre

Conserver à 4° C à l'obscurité.

III. MODE OPERATOIRE.

Dans chaque tube à essai, introduire 0,5 ml de solution de pyruvate de sodium et placer quelques secondes au bain-marie à 37° C. Puis ajouter 0,2 ml de chlorure mercurique dans tous les tubes sauf dans le tube témoin. Ajouter ensuite le produit à étudier aux différentes concentrations, 0,1 ml de solution enzymatique et 0,1 ml de NADH. Agiter, incuber au bain-marie à 37° C pendant 15 ou 30 minutes. Au terme de l'incubation, ajouter 1 ml de solution de 2-4 dinitro-phénylhydrazine qui arrête la réaction et développe la coloration. Agiter doucement ; attendre 20 minutes à la température du laboratoire puis ajouter 10 ml de soude 0,4 N. Agiter. Lire au photocolorimètre à 525 nanomètres, 5 minutes au minimum après addition de soude, 30 minutes au maximum.

L'étalonnage est effectué en répartissant dans différents tubes : 0 ; 0,1 ; 0,2 ; ... 0,5 ml d'une solution de pyruvate de sodium 0,002 M et 0,7 ; 0,6 ; 0,5 ; ... 0,2 ml d'eau distillée. Dans tous les tubes, on ajoute 0,2 ml de chlorure mercurique et 0,3 ml de solution du produit étudié à la concentration correspondante. Le chlorure mercurique se trouve à la dose de $0,05 \cdot 10^{-4}$ g/ml.

IV. RESULTATS

Nous rapportons les résultats obtenus avec la pénicillamine dans le tableau X. Le tableau XI représente un tableau comparatif avec les autres produits à leur dose la plus active.

Tableau X :

Pourcentage d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats de foie de souris au 1/1000e après action du chlorure mercurique et de la pénicillamine *in vitro*.

Temps d'incubation		15 minutes		30 minutes	
Concentration dans le milieu réactionnel		M	α	M	α
HgCl ₂ en g/ml x 10 ⁻⁴	Pénicillamine en g/ml x 10 ⁻⁴				
0	0	35,4	2,0	57,0	3,7
0,05	0	5,4	1,5	7,8	1,1
0,05	0,01	4,9	2,3	8,0	3,6
0,05	0,025	17,5	2,5	21,7	1,6
0,05	0,05	32,8	0,5	42,9	3,7
0,05	0,1	36,0	1,9	64,9	2,3

Tableau XI

Temps d'incubation	Doses en g/mlx10 ⁻⁴	Doses en μ mole/ml	15 minutes		30 minutes	
			M	α	M	α
Témoin			35,4	2,0	57,0	3,7
Témoin HgCl ₂ 0,05 10 ⁻⁴ g/ml		0,025	5,4	1,5	7,8	1,1
Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique)	1,5	0,65	21,0	0,5	26,8	2,2
Pénicillamine	0,1	0,06	36,0	1,9	64,9	2,3
EDTA	0,2	0,05	33,6	3,1	50,4	3,7
Methionine	30	20,1	34,1	3,2	50,3	3,9
Acide chromone carboxylique -2	10	5,2	6,0	1,7	9,1	2,5

La méthionine, le tétracémate disodique et la pénicillamine lèvent l'inhibition mercurique de la LDH *in vitro*. Les doses de méthionine nécessaires sont toutefois beaucoup plus fortes que celles de tétracémate disodique et de pénicillamine.

Par ailleurs, la pénicillamine semble être la plus active puisque l'inhibition mercurique de la LDH est entièrement levée à la dose la plus forte utilisée.

Comparativement, l'activité de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) qui ne provoque une levée d'inhibition moyenne que d'environ 45 % semble d'autant inférieure.

L'absence d'activité de l'acide chromone carboxylique -2 est également rappelée.

V. CONCLUSION.

Vis-à-vis de l'inhibition mercurique de la LDH *in vitro*, l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) possède une activité protectrice moins intéressante que celle relevée précédemment *in vivo* vis-à-vis de l'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris. Par contre, la méthionine, l'EDTA et surtout la pénicillamine présentent toujours une protection très efficace. Quant à l'acide chromone carboxylique -2, il ne possède aucune activité protectrice.

C H A P I T R E I I I

INFLUENCE DES DIFFERENTES DROGUES SUR L'ELIMINATION DU MERCURE.

Nous avons vu qu'*in vivo*, l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) possède une activité protectrice intéressante au moins aussi importante, sinon plus, que l'EDTA et la méthionine vis-à-vis de l'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris. La pénicillamine semble être toutefois plus active que ces dérivés.

In vitro par contre, la protection exercée par l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) est moins importante. L'acide chromone carboxylique -2 n'ayant aucune activité contrairement à ce qui se passe *in vivo*, l'hypothèse d'une biotransformation *in vivo* de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) en son métabolite probable l'acide chromone carboxylique -2 avait donc été émise, pour expliquer l'effet supérieur obtenu *in vivo*. (54)

Quant à la Pénicillamine, comme précédemment elle semble être la plus active.

Nous avons voulu approfondir cette étude comparative, en recherchant l'influence de ces différents produits sur l'excrétion du mercure par ses deux voies principales d'élimination, c'est-à-dire par l'urine et par les fèces. (98)

Le mercure peut provoquer des intoxications aiguës, provenant de l'absorption accidentelle de ses sels en grande quantité ou des intoxications chroniques, qui se rencontrent sous la forme de maladies professionnelles, liées à l'emploi du mercure sans précautions spéciales.

Le mercure possède deux propriétés fondamentales qui sont sa volatilité qui lui permet de pénétrer par voie pulmonaire, et sa très longue rétention dans l'organisme qui en fait le type même des poisons cumulatifs (98).

De nombreux travaux ont été effectués sur la distribution et l'élimination de sels mercuriques (55, 46, 97, 113, 146). En particulier, Cember (27, 28) a constaté que l'augmentation de la dose de nitrate mercurique n'a aucun effet sur la distribution, sauf pour les reins qui emmagasinent une fraction croissante de la quantité injectée quand la dose augmente.

En présence d'agents chélateurs, on observe une redistribution du métal dans les divers secteurs de l'organisme (50, 100, 142).

La distribution intracellulaire du chlorure mercurique a été étudiée (103). On en trouve dans les mitochondries, les lysosomes, les peroxyosomes et les microsomes. En fonction du temps, il y a accumulation du mercure dans les lysosomes.

L'élimination est très lente et s'effectue par l'urine, la salive et les matières fécales en particulier, accessoirement la sueur, la bile, le lait (139).

Au cours de l'intoxication aiguë, le développement rapide de la néphrite supprime l'élimination urinaire qui s'effectue alors par la salive, la sueur et les matières fécales (98, 141).

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Nous avons recherché la quantité de mercure présente dans les urines et dans les fèces chez des animaux intoxiqués par administration de chlorure mercurique.

Il est utilisé des lots homogènes de quatre souris albinos IFFA (OF₁) mâles et femelles d'un poids moyen de 20 g. Les souris sont soumises à un régime alimentaire normal. Le mercure est administré à la dose de 75 mg/kg (0,27 μ mole/kg) en une fois *per os*.

Les produits protecteurs sont administrés 24 h et 15 minutes avant l'intoxication au chlorure mercurique, puis toutes les 24 heures.

On donne également 1 ml de sérum physiologique à 1,8 % en même temps que le mercure, puis toutes les 24 heures (33).

La méthionine, l'EDTA et l'acide chromone carboxylique -2 sont utilisés à leur dose la plus active ; l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) et la pénicillamine, plus actifs *in vivo*, sont utilisés à dose intermédiaire.

Certains lots ne sont pas protégés afin de servir de lots témoins.

Les animaux sont ensuite isolés dans des cages à métabolisme où l'urine est recueillie dans un tube gradué. On obtient en général un volume de 5 cc d'urine par 24 heures, qu'on porte à 20 cc avec de l'eau distillée.

Les fèces peuvent être recueillis en même temps.

Les dosages sont effectués 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures après l'intoxication.

II. METHODES.

1) Dosage du mercure dans les urines :

Principe : La dithizone ou diphényl-thiocarbazone donne avec l'ion mercurique des complexes solubles dans le chloroforme, de couleur jaune orangé et stables en milieu acide. La dithizone elle-même en solution chloroformique est colorée en vert (150).

La technique utilisée est celle de FABRE, TRUHAUT et BOUDENE (51).

Réactifs :

*Acide sulfurique concentré

*Solution de permanganate de potassium saturée :

14,2 parties à froid

3,2 parties à chaud

A conserver en flacons colorés.

*Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine saturée :

83 g dans 100 ml d'eau à 17 °.

*Solution d'urée à 10 %.

*Solution d'EDTA à 2,5 %.

*Solution d'acétate de sodium à 50 %.

*Solution d'acide oxalique à 3 %.

*Solution de dithizone : Faire une solution mère de 100 mg de dithizone dans 100 ml de chloroforme.

Diluer extemporanément au 1/250e.

*Solution de chlorure mercurique : faire une solution mère de 677 mg/l de chlorure mercurique, et la diluer au 1/100e.

Mode opératoire :

La minéralisation se fait par le permanganate de potassium en milieu sulfurique, sous un réfrigérant à reflux. La concentration en acide sulfurique est juste suffisante pour utiliser au maximum les propriétés oxydantes de l'ion Mn^{++} dont un léger excès est maintenu au cours de la minéralisation. Le chauffage est réalisé avec un micro-brûleur de façon à éviter un dégagement tumultueux de chlore pouvant entraîner un peu de chlorure mercurique malgré le réfrigérant.

Après cette opération, on élimine l'excès de permanganate par l'addition de 1 ml de chlorhydrate d'hydroxylamine, puis on détruit les produits nitreux éventuellement formés par l'addition de 2 ml d'urée. On ajoute 1 ml de la solution d'EDTA, puis on ajuste le pH à 1,5 par addition d'acétate de sodium et d'acide oxalique. L'extraction du mercure se fait par une solution chloroformique diluée de dithizone. Cette solution est ajoutée en léger excès de façon à obtenir une teinte sensible lilas-mauve résultant de la superposition de la teinte rose du complexe mercuriel et de la teinte bleu-vert de la dithizone libre.

Le même volume de cette solution chloroformique est introduit dans un tube identique contenant les réactifs utilisés pour la minéralisation et le dosage dans l'urine et ajoutés dans le même ordre. La couche chloroformique reste bleu-vert et une solution titrée de chlorure mercurique est alors ajoutée jusqu'à virage à la teinte lilas-mauve sensible obtenue dans la fiole correspondant à l'urine.

Remarques :

*Le choix du pH 1,5 et l'addition d'EDTA rend l'extraction du mercure par la dithizone spécifique, en évitant l'interférence d'autres ions métalliques, en particulier le cuivre, même à des doses nettement supérieures à celles susceptibles d'être trouvées dans l'urine.

*L'élimination des ions nitreux supprime l'action oxydante qu'ils exerceraient sur la dithizone en la transformant en un composé incapable de complexer le mercure.

La technique permet d'apprécier $0,05 \mu\text{g}$ de mercure avec une précision de 5 % environ.

2) Dosage du mercure dans les fèces :

Le principe reste basé sur la formation de complexes colorés entre le mercure et la dithizone. La minéralisation est d'autant plus longue que le milieu est complexe. Nous avons donc utilisé la méthode de minéralisation de TOMPSETT (139).

Réactifs :

- * Acide sulfurique concentré
- * Acide nitrique concentré
- * Solution de permanganate de potassium à 5 %
- * Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 20 %
- * Poudre de Selenium
- * Solution d'urée à 10 %
- * Solution d'acide oxalique à 3 %
- * Solution d'acétate de Na à 50 %
- * Solution de dithizone
- * Solution de chlorure mercurique.

Mode opératoire :

Les fèces sont émulsifiées dans de l'eau distillée et amenés à une dilution convenable. On porte 20 ml de cette suspension dans un ballon de 100 ml. La minéralisation se fait en présence du mélange sulfonitrique et de la poudre de sélénium. On maintient l'ébullition pendant trois heures puis on ajoute la solution de permanganate de potassium. On reporte à ébullition pendant une heure environ, et on filtre en ayant bien soin d'entraîner tout le mercure. (Le sélénium déplace le mercure de ses combinaisons protéiques). Sur le minéralisat, on procède comme avec l'urine.

III. RESULTATS.

Les résultats obtenus figurent sur les tableaux suivants.

Tableau XII

Quantité de mercure excrété dans l'urine
après intoxication au chlorure mercurique.

Lot	Doses mg/kg	Quantité de Hg ⁺⁺ administrée en μmole/kg		Quantité de mercure en μmole/kg x 10 ⁻² excrété aux temps considérés			
				24 h	48 h	72 h	96 h
Témoin	0	0,2	M	0,41	0,60	0,70	0,80
			α	0,20	0,10	0,30	0,20
Acide chromone carbo- hydroxamique-2 (sel sodique)	200	0,2	M	0,88	1,02	1,11	1,14
			α	0,15	0,30	0,20	0,25
Acide chromone carboxylique-2	100	0,2	M	0,50	0,62	0,74	0,81
			α	0,10	0,15	0,20	0,25
Pénicillamine	200	0,2	M	1,97	2,35	2,65	2,86
			α	0,45	0,35	0,50	0,25
Méthionine	400	0,2	M	0,82	0,96	1,09	1,18
			α	0,30	0,35	0,15	0,25
EDTA	100	0,2	M	0,69	0,83	0,98	1,02
			α	0,20	0,25	0,30	0,20

Tableau XIII

Pourcentage de mercure excrété dans l'urine
après intoxication au chlorure mercurique.

Lot	Doses en mg/kg					
			24 h	48 h	72 h	96 h
Témoïn	0	M	2,09	2,76	3,63	3,99
		α	1,0	0,50	0,70	0,60
Acide chromone carbo- hydroxamique-2 (sel sodique)	200	M	4,40	5,10	5,57	5,73
		α	0,75	1,00	0,80	0,60
Acide chromone carboxylique-2	100	M	2,40	3,14	3,72	4,09
		α	0,60	0,75	0,95	0,80
Pénicillamine	200	M	9,86	11,80	13,30	14,30
		α	2,15	1,80	2,0	1,70
Méthionine	400	M	4,10	4,80	5,45	5,93
		α	1,0	1,25	0,75	0,9
EDTA	100	M	3,46	4,18	4,89	5,12
		α	0,7	0,8	0,6	1,0

Fig. 1 : Pourcentage de mercure excrété dans l'urine.

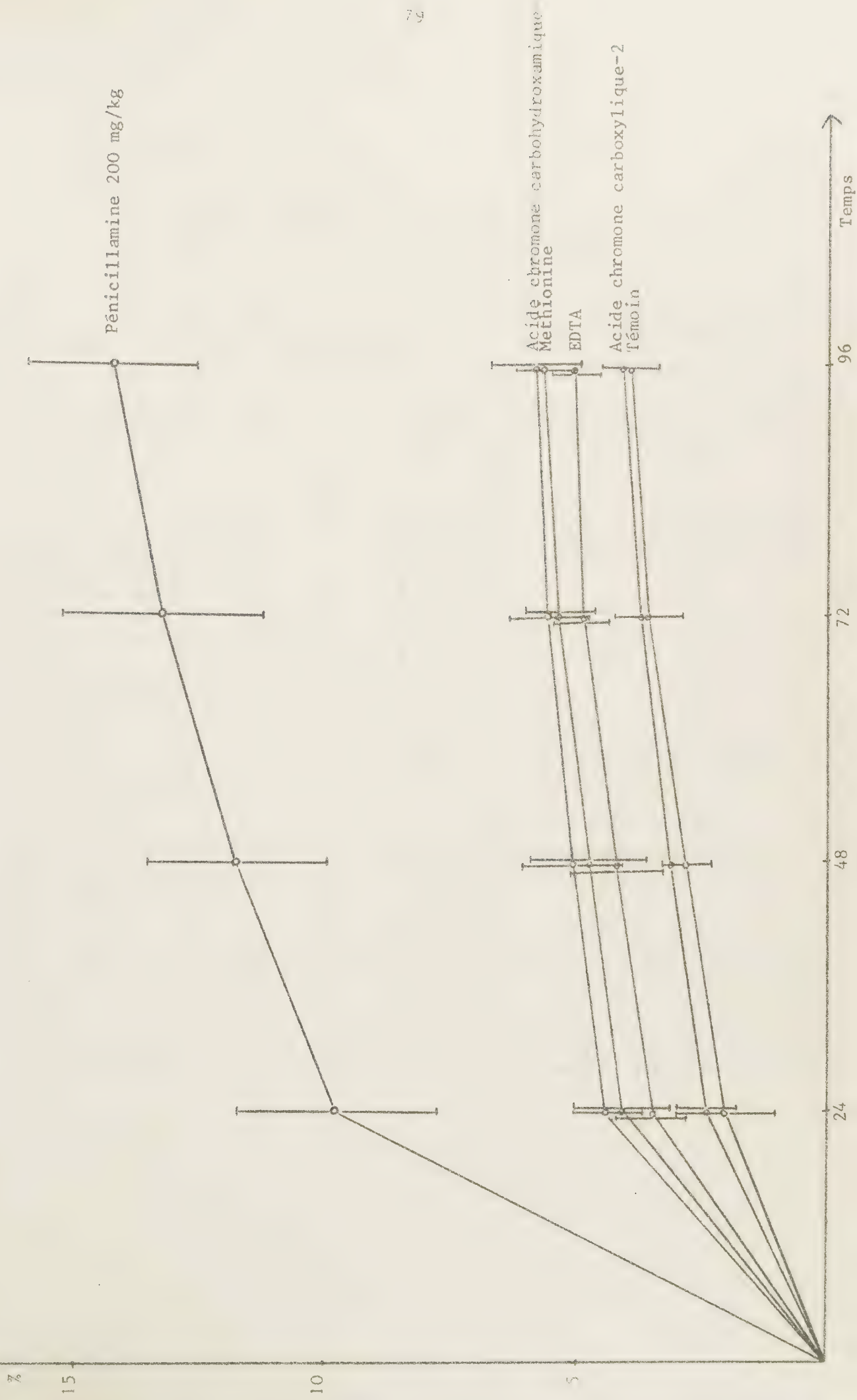


Tableau XIV

Quantité de mercure excrété dans les fèces
après intoxication au chlorure mercurique.

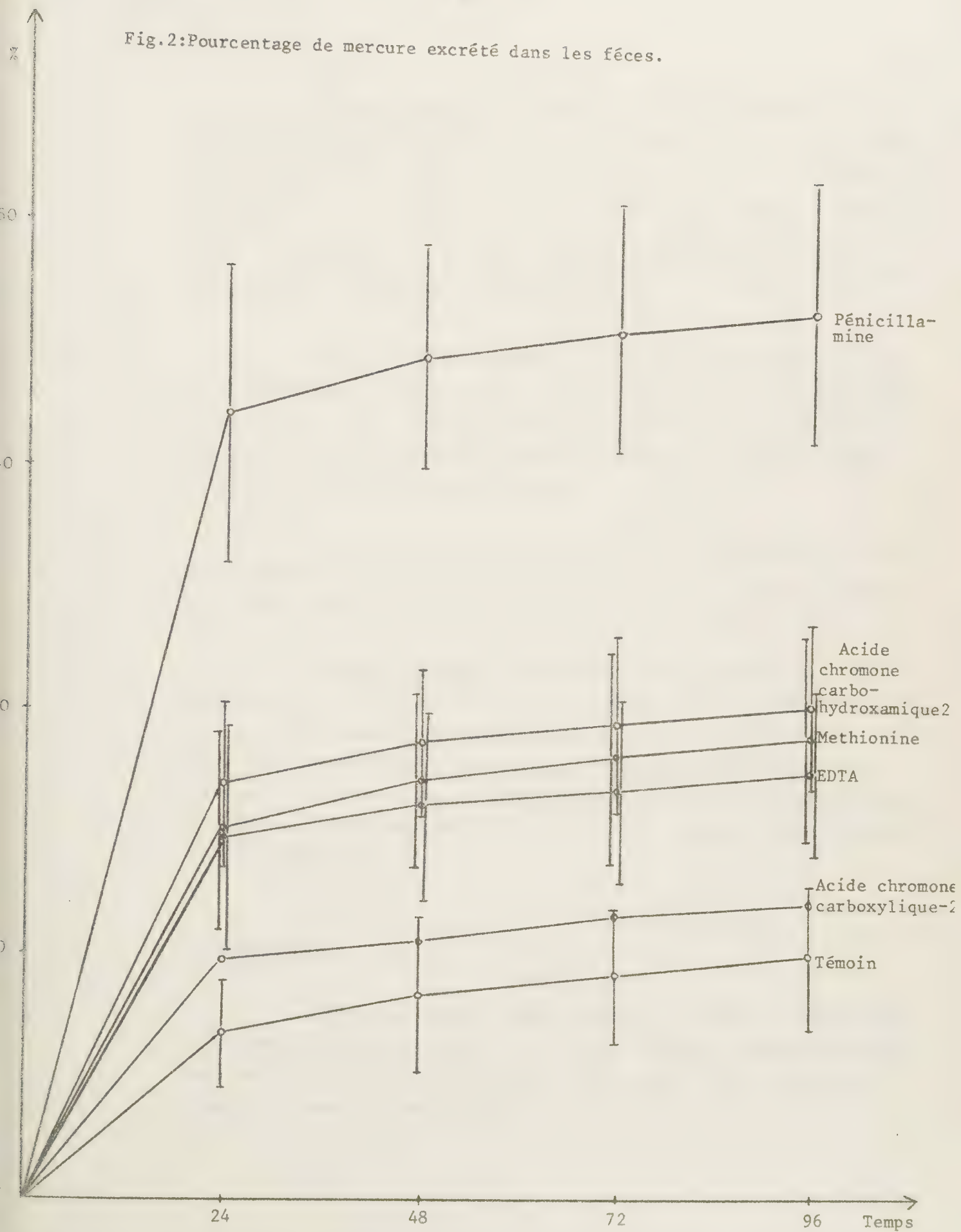
Lot	Doses en mg/kg	Quantité de Hg^{++} administrée en $\mu mole/kg$		Quantité de mercure en $\mu mole/kg \times 10^{-2}$			
				24 h	48 h	72 h	96 h
Témoin	0	0,2	M	3,3	3,6	3,8	4,0
			α	1,2	0,8	0,7	0,9
Acide chromone carbo- hydroxamique-2 (sel sodique)	200	0,2	M	5,4	5,7	5,9	6,0
			α	1,3	0,7	0,8	0,5
Acide chromone carboxylique-2	100	0,2	M	3,9	4,1	4,3	4,4
			α	0,5	0,8	1,1	1,0
Pénicillamine	200	0,2	M	8,4	9,0	9,1	9,3
			α	2,6	2,3	2,5	0,9
Methionine	400	0,2	M	5,0	5,4	5,6	5,8
			α	1,4	1,1	0,7	0,8
EDTA	100	0,2	M	4,9	5,2	5,3	5,5
			α	2,0	0,6	0,7	0,7

Tableau XV

Pourcentage de mercure excrété dans les fèces
après intoxication au chlorure mercurique.

Lot	Doses en mg/kg		24 h	48 h	72 h	96 h
Témoïn	0	M	16,9	18,4	19,3	20,1
		α	2,2	3,2	2,9	3,0
Acide chromone carbohydroxamique-2 (sel sodique)	200	M	27,1	28,8	29,6	30,4
		α	3,4	3,0	3,8	3,5
Acide chromone carboxylique-2	100	M	19,8	20,7	21,6	22,3
		α	3,1	2,0	2,6	3,0
Pénicillamine	200	M	42,3	44,6	45,7	46,6
		α	6,2	4,6	5,2	5,4
Methionine	400	M	25,2	27,3	28,3	29,1
		α	4,2	3,7	4,4	4,0
EDTA	100	M	24,8	26,2	26,9	27,6
		α	4,6	4,0	3,8	3,4

Fig.2: Pourcentage de mercure excrété dans les fèces.



1) Dans l'urine, on observe une faible excrétion urinaire du mercure. Sur le tableau XII, nous avons exprimé la quantité de mercure excrété. Nous voyons que tous les dérivés utilisés provoquent une augmentation de la quantité de mercure excrété par rapport au témoin. Le moins actif semble être l'acide chromone carboxylique -2, le plus actif la pénicillamine. Ce dernier dérivé augmente en effet de façon considérable l'excrétion urinaire du mercure.

Les trois autres dérivés sont à peu près également actifs, mais moins que la pénicillamine. En particulier, l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) augmente significativement l'excrétion urinaire du mercure, qui est environ le double de celle des animaux témoins au temps 24 heures par exemple.

Dans le tableau XIII, nous retrouvons ces résultats. Nous avons exprimé le pourcentage de mercure excrété par rapport à la quantité administrée et pouvons suivre ces variations sur la figure 1.

2) Dans les fèces, les résultats sont exprimés dans les tableaux XIV et XV, ainsi que sur la figure 2. Ils vont dans le même sens que précédemment. La pénicillamine provoque la plus forte excrétion, et l'acide chromone carboxylique -2 la plus faible. En ce qui concerne l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique), elle possède une activité intermédiaire au moins aussi importante que la méthionine et l'EDTA sinon plus.

IV. CONCLUSION.

Nous avons étudié comparativement à l'EDTA, la méthionine et la pénicillamine, l'influence de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) et de l'acide chromone carboxylique -2 sur l'excrétion urinaire et fécale du mercure chez la Souris.

Nous avons noté pour tous ces dérivés une augmentation de cette excrétion qui semble être en relation avec une action déttoxicante. Le mercure étant un poison cumulatif, le fait d'augmenter son élimination diminue ses effets toxiques.

Les résultats obtenus dans ce chapitre semblent pouvoir être comparés avec ceux des activités protectrice proprement dites. En effet, la pénicillamine qui possède l'activité protectrice la plus importante provoque la plus forte excrétion, l'acide chromone carboxylique -2 la plus faible et en ce qui concerne l'acide chromone carboxylique -2 (sel sodique), il augmente l'excrétion urinaire d'une façon intéressante, au moins aussi importante, sinon plus, que l'EDTA et la methionine.

C H A P I T R E I V

DISCUSSION SUR LA PROTECTION EXERCEE

Nous avons vu que l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) possédait *in vivo* une activité protectrice au moins aussi importante que la méthionine et le tétracémate disodique lors de l'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris, la pénicillamine possédant l'activité la plus importante et l'acide chromone carboxylique -2 l'activité la plus faible.

Par contre *in vitro*, l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) agit de façon beaucoup moins satisfaisante que la méthionine, le tétracémate disodique ou la pénicillamine vis-à-vis de l'inhibition mercurique de la L.D.H. Quant à l'acide chromone carboxylique -2, il n'entraîne aucune protection.

Nous avons ensuite montré que les différents produits étudiés augmentaient l'excrétion urinaire et fécale du mercure. Cette augmentation est en relation avec le degré d'activité observé *in vivo*.

Nous avons repris ici nos résultats sous forme d'histogrammes reproduits sur les figures 3 à 6. Ceux-ci nous permettent de comparer plus aisément les différents produits considérés aux doses les plus efficaces.

Nous voyons ainsi que l'activité de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique), due à la fonction acide carbohydroxamique *in vitro*, à laquelle s'ajoute l'influence du cycle chromone *in vivo* (54), est très intéressante mais semble être toutefois moins importante que celle de la pénicillamine.

Dans un deuxième temps, nous avons plus spécialement examiné les résultats relatifs à l'augmentation de l'excrétion urinaire et fécale du mercure.

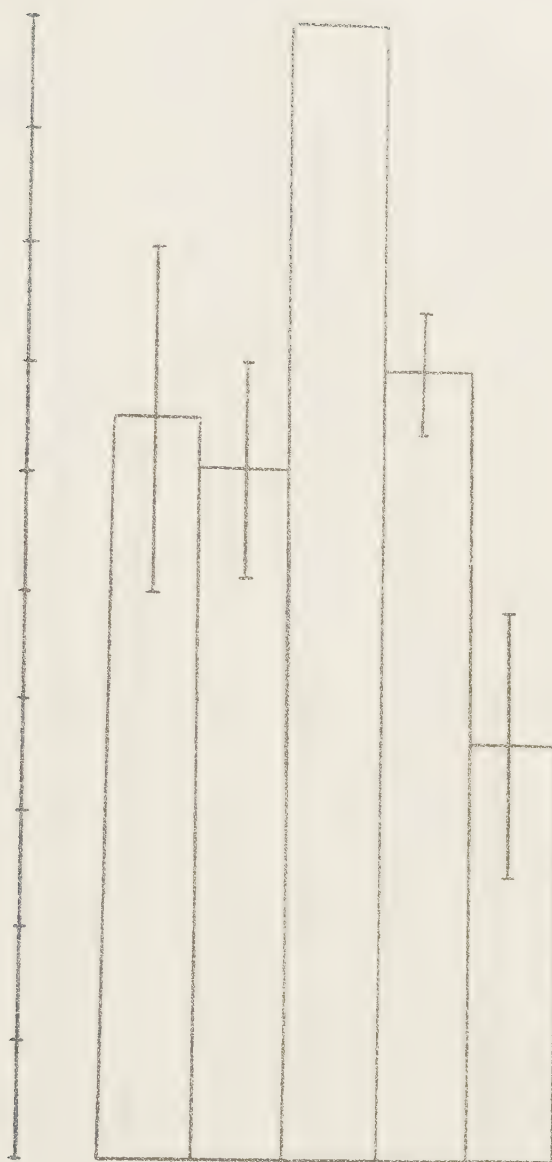


Fig. 3 : Activités protectrices *in vivo*, vis-à-vis de l'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris.

- | | |
|---|-------------|
| 1 Methionine | (400 mg/kg) |
| 2 Tétracémate disodique | (100 mg/kg) |
| 3 Pénicillamine | (400 mg/kg) |
| 4 Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) | (400 mg/kg) |
| 5 Acide chromone carboxylique -2 | (100 mg/kg) |

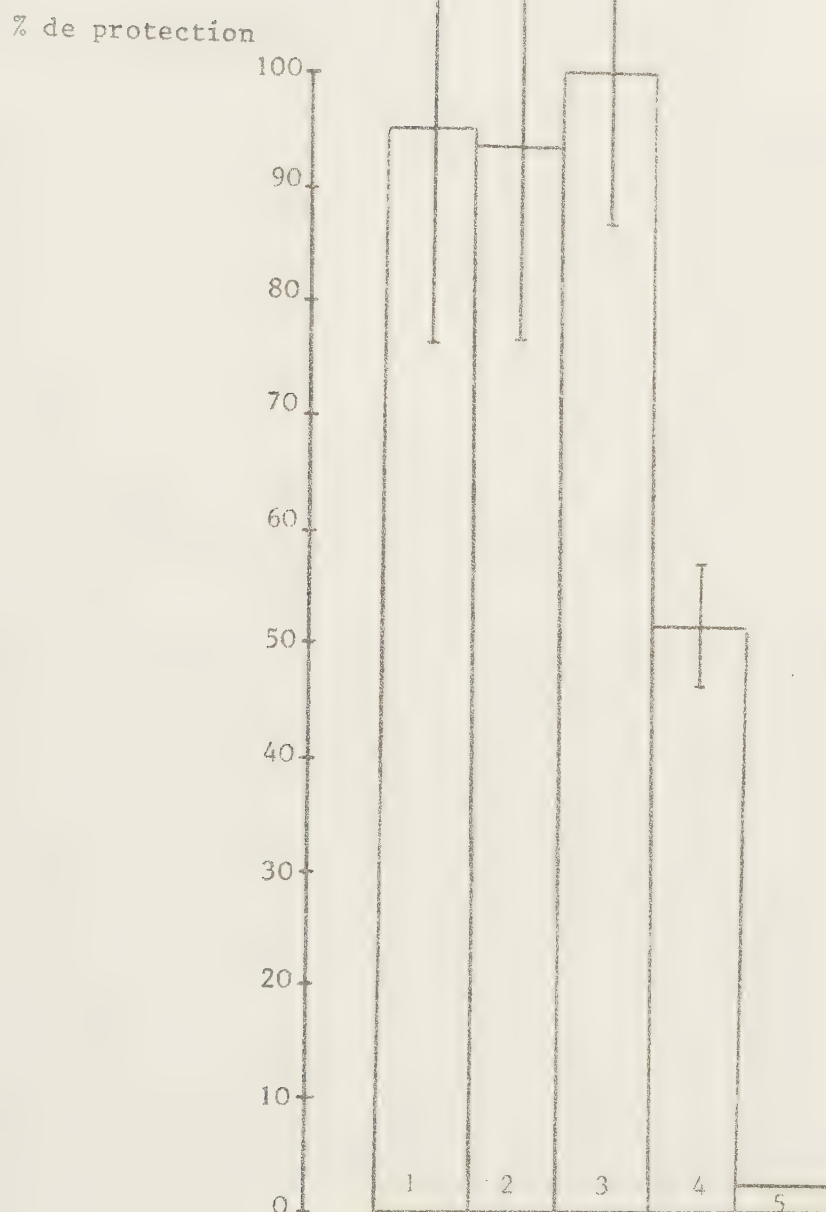


Fig. 4a : Activités protectrices vis-à-vis de l'inhibition mercurique de la LDH *in vitro*. Incubation 15 minutes.

1 Methionine	(30.10 ⁻⁴ g/ml)
2 Tétracémate disodique	(0,2.10 ⁻⁴ g/ml)
3 Pénicillamine	(0,1.10 ⁻⁴ g/ml)
4 Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique)	(1,5.10 ⁻⁴ g/ml)
5 Acide chromone carboxylique -2	(4.10 ⁻⁴ g/ml)

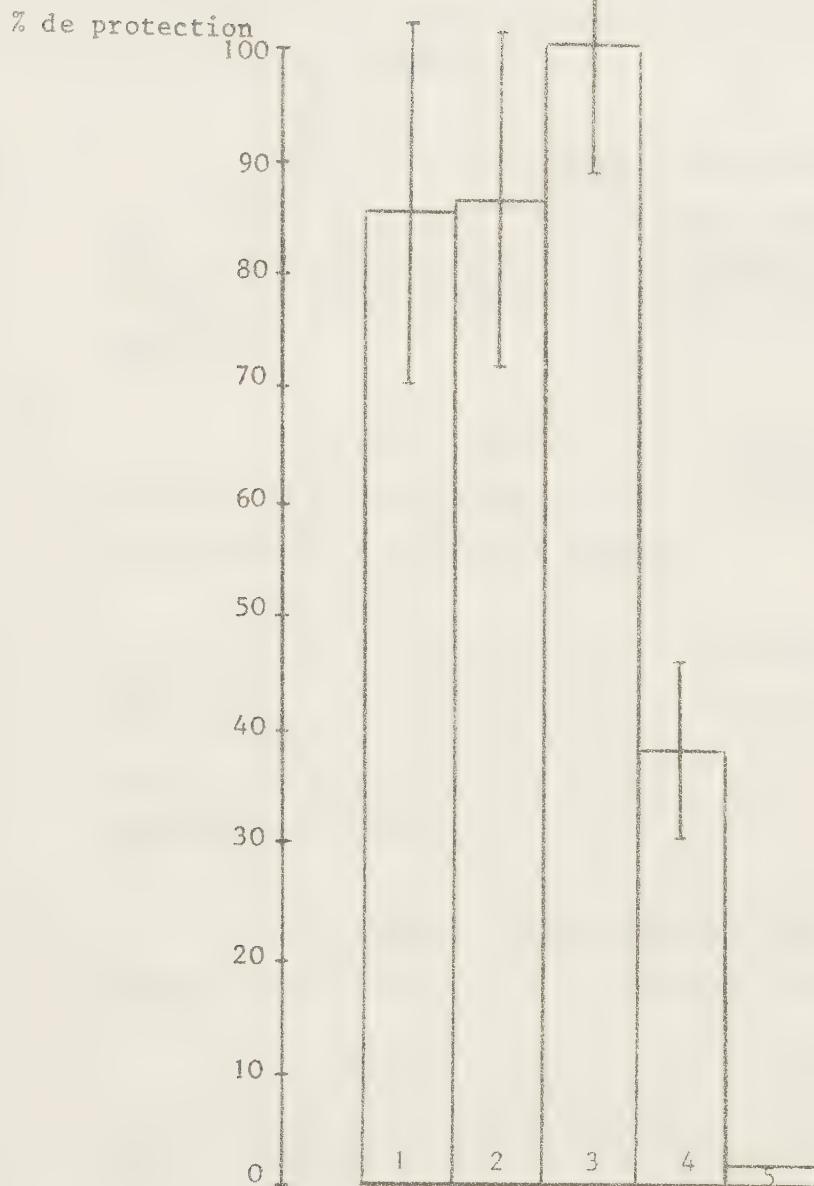


Fig. 4b : Activités protectrices vis-à-vis de l'inhibition mercurique de la LDH *in vitro*. Incubation 30 minutes.

1 Methionine	($30 \cdot 10^{-4}$ g/ml)
2 Tétracémate disodique	($0,2 \cdot 10^{-4}$ g/ml)
3 Pénicillamine	($0,1 \cdot 10^{-4}$ g/ml)
4 Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique)	($1,5 \cdot 10^{-4}$ g/ml)
5 Acide chromone carboxylique -2	($4 \cdot 10^{-4}$ g/ml)

On note une augmentation importante de l'excrétion urinaire du mercure au temps 24 heures par rapport aux autres temps, ceci pour toutes les drogues.

Pour l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) et la methionine, l'excrétion du mercure est multipliée par 2 environ, alors qu'avec le calcitétracémate disodique elle est multipliée par 1,5. Pour la pénicillamine, l'excrétion urinaire du mercure est multipliée par 4.

Aux temps suivants, on observe un ralentissement de l'augmentation de l'excrétion du mercure et les quantités excrétées sont peu supérieures à celles des témoins.

Les produits provoquent des modifications importantes de l'excrétion urinaire du mercure et ils semblent très actifs en début d'intoxication, au temps 24 heures. Par la suite, il semblerait que le mercure soit solidement fixé au niveau des tissus, ce qui rendrait son excrétion plus difficile.

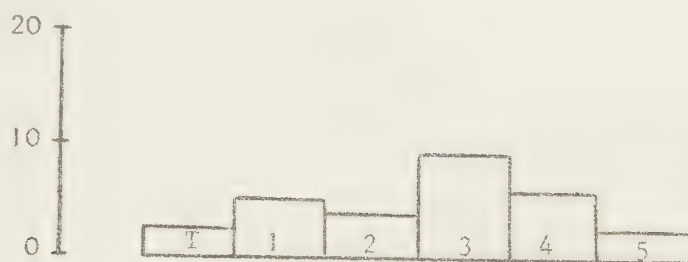
On constate le même phénomène dans l'excrétion fécale du mercure. Celle-ci est de 5 à 10 fois plus importante que dans l'urine.

Il semblerait donc que les molécules étudiées présentent un caractère beaucoup plus préventif que curatif vis-à-vis d'une intoxication aiguë par le mercure bivalent.

L'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) semble avoir un mode d'action voisin des autres dérivés (EDTA, pénicillamine, methionine). En particulier, les courbes de cinétique d'élimination ont la même allure.

De toutes façons, la protection exercée en début d'intoxication semble intéressante d'autant plus que l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) présente une toxicité modérée et possède peu d'effets pharmacologiques secondaires (52). Elle doit pouvoir contribuer à diminuer les manifestations toxiques du mercure sur l'organisme.

% d'excrétion



24 heures

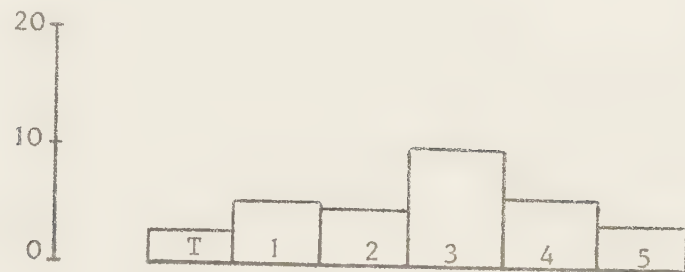


48 heures

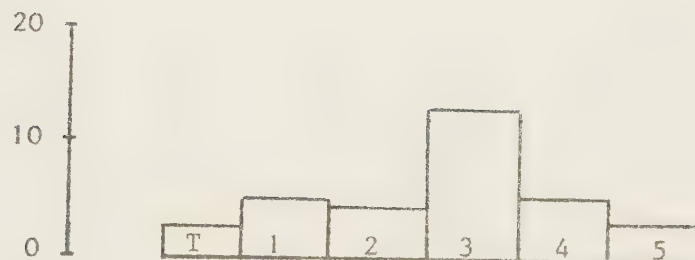
Fig. 5a : Pourcentage de mercure excrété dans l'urine après intoxication au chlorure mercurique.

- | | | |
|---|---|-------------|
| 1 | Méthionine | (400 mg/kg) |
| 2 | Calcitétracémate disodique | (100 mg/kg) |
| 3 | Pénicillamine | (200 mg/kg) |
| 4 | Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) | (200 mg/kg) |
| 5 | Acide chromone carboxylique -2 | (100 mg/kg) |

% d'excrétion



72 heures

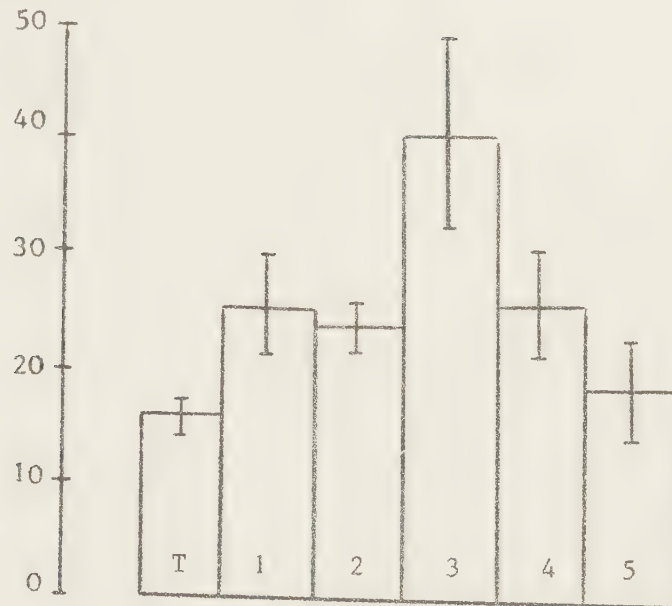


96 heures

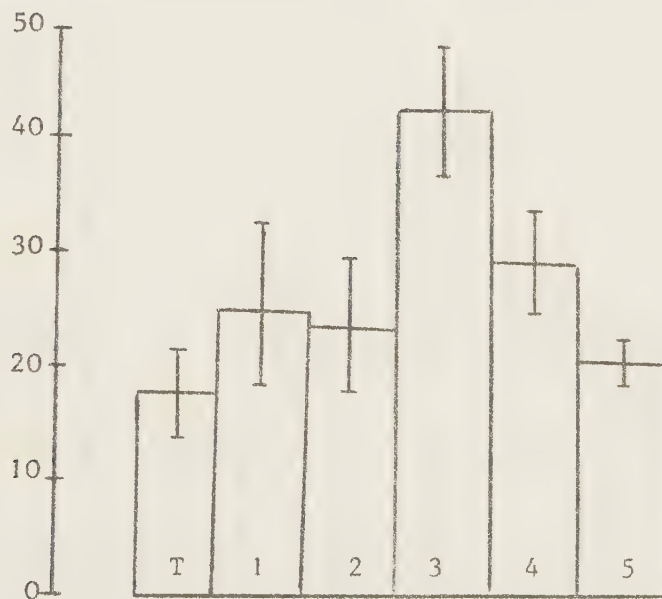
Fig. 5b : Pourcentage de mercure excrété dans l'urine après intoxication au chlorure mercurique.

- | | | |
|---|---|-------------|
| 1 | Methionine | (400 mg/kg) |
| 2 | Calcitétracémate disodique | (100 mg/kg) |
| 3 | Pénicillamine | (200 mg/kg) |
| 4 | Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) | (200 mg/kg) |
| 5 | Acide chromone carboxylique -2 | (100 mg/kg) |

% d'excrétion



24 heures



48 heures

Fig. 6a : Pourcentage de mercure excrété dans les fèces après intoxication au chlorure mercurique.

- | | | |
|---|---|-------------|
| 1 | Methionine | (400 mg/kg) |
| 2 | Calcitétracémate disodique | (100 mg/kg) |
| 3 | Pénicillamine | (200 mg/kg) |
| 4 | Acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) | (200 mg/kg) |
| 5 | Acide chromone carboxylique -2 | (100 mg/kg) |

% d'excrétion

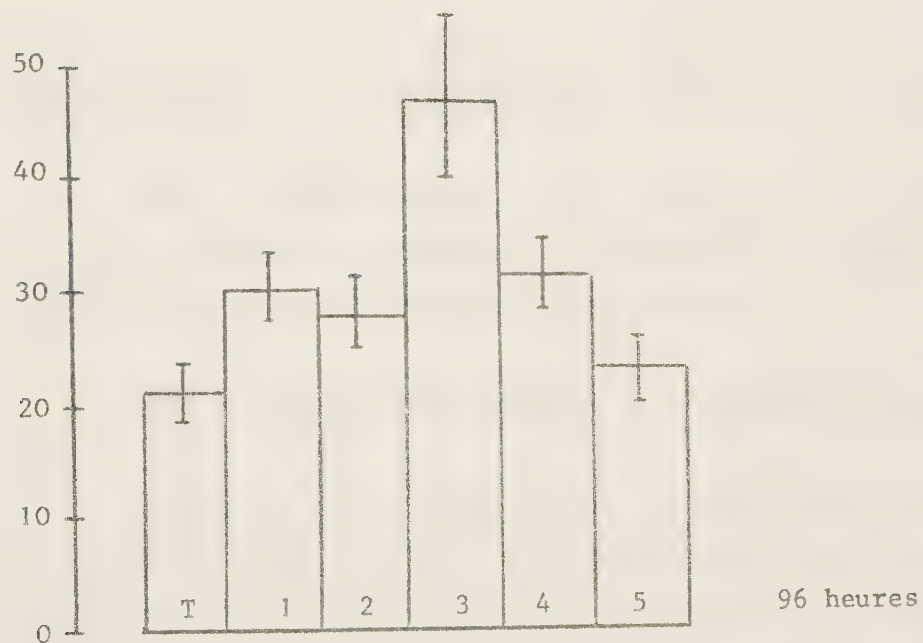
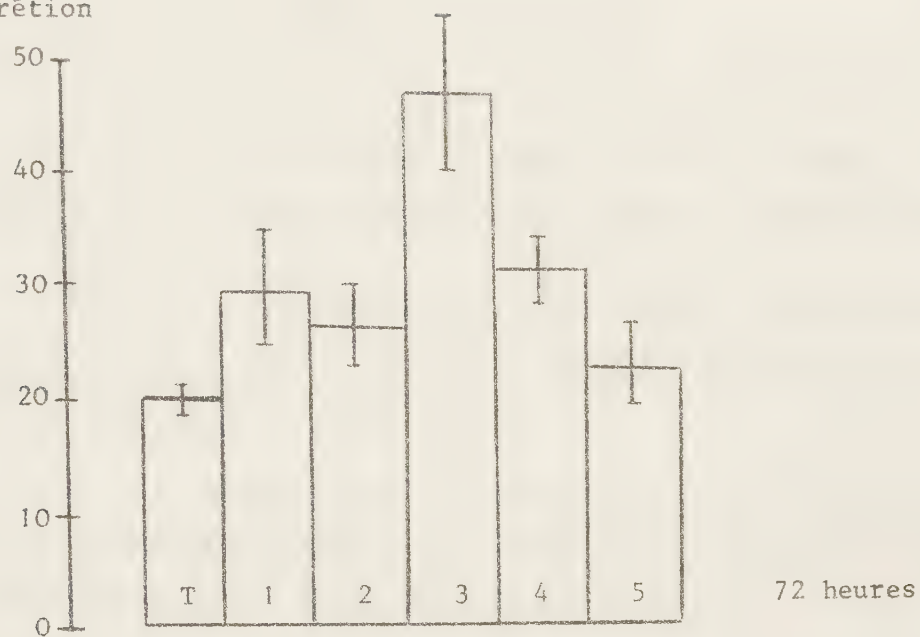


Fig. 6b : Pourcentage de mercure excrété dans les fèces après intoxication au chlorure mercurique.

RESUME ET CONCLUSIONS

Ce travail s'inscrit dans une suite de recherches expérimentales sur les propriétés des acides chromone carbohydroxamique -2.

Notre étude bibliographique comporte quatre parties. Dans la première partie, nous avons explicité la formation des complexes du point de vue chimique.

La deuxième partie a été consacrée au phénomène biochimique de la chélation. Nous avons montré qu'elle occupe une place très importante au niveau du métabolisme cellulaire.

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'aspect pharmacologique de la chélation. Pour certains médicaments en effet, il n'y a pas d'activité pharmacologique sans la formation préalable de complexes avec des métaux. D'autres médicaments peuvent former ou non des complexes métalliques sans que cela influe sur leurs activités.

Dans la dernière partie, nous avons étudié des produits connus comme chélateurs et spécialement utilisés en tant que détoxifiants dans les intoxications par des métaux lourds.

Dans la partie expérimentale, on distingue également quatre parties :

Nous avons tout d'abord étudié l'activité protectrice *in vivo* de la pénicillamine vis-à-vis de l'intoxication expérimentale au chlorure mercurique chez la Souris. Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux de l'acide carbohydroxamique -2 (sel sodique), de l'acide chromone carboxylique -2, de la methionine et de l'EDTA.

Nous avons ensuite comparé l'activité des différents produits sur la levée de l'inhibition mercurique de la LDH *in vitro*.

Nous avons alors recherché l'influence de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) et de son métabolite probable l'acide chromone carboxylique -2 sur l'élimination urinaire et fécale du mercure chez la Souris, et montré que le dérivé original étudié provoquait chez cet animal une excrétion du mercure aussi importante que la methionine et l'EDTA, mais de moitié moins importante que la pénicillamine.

De ces études, nous avons abouti à la conclusion générale suivante :

- d'une part, l'activité de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) due à la fonction acide carbohydroxamique *in vitro*, à laquelle s'ajoute l'influence du cycle chromone *in vivo* est intéressante.

- d'autre part, il y a un parallélisme entre les activités protectrices *in vivo* et *in vitro* de l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique), de la méthionine, de l'EDTA et de la pénicillamine et l'influence de ces différents produits sur l'excrétion urinaire et fécale du mercure. La pénicillamine est toujours la plus active.

- par ailleurs, ces dérivés ont, semble-t-il, un mode d'action voisin que l'on peut observer au niveau de leur influence sur l'excrétion du mercure qui est plus importante en début d'intoxication.

En conclusion, l'acide chromone carbohydroxamique -2 (sel sodique) peut permettre de diminuer les manifestations toxiques du mercure dans l'organisme, d'autant plus que par lui-même il présente une toxicité modérée (la DL₅₀ est de 2,19 g/kg *per os* chez la Souris) et ne possède que de très légers effets pharmacologiques non gênants pour l'expérimentation.

Vu, Clermont-Ferrand, le 28 avril 1976
Le Président du Jury


P. BASTIDE

Vu, Clermont-Ferrand, le 29 Avril 1976
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie



Vu et Permis d'Imprimer n° Ph.2/1976

Clermont-Ferrand, le 5 mai 1976
L'Administrateur Provisoire de Clermont I


L. GISCLARD



B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AHRLAND S. : Acta. Chem. Scand., 1956, 10, 723.
- 2 - ALBERT A. : Federation Proc., 1961, 20, 137.
- 3 - ALBERT A. : Biochem. J., 1950, 47, 531.
- 4 - ALBERT A. : Biochem. J., 1952, 50, 690.
- 5 - ALBERT A. : Australian Journal of Science, 1967, 30, 1.
- 6 - ANDEREGG G., et al : Helvet. Chim. Acta., 1963, 46, 1400.
- 7 - APOSCHIAN H.V. : Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol., 1961, 20 (suppl. 10), 185-188.
- 8 - ASATOOR A.M. : Nature Lond , 1964, 203, 1382.
- 9 - BACQ Z.M., et al : Pharmacodynamie biochimique, Masson, Paris, 1961.
- 10 - BAILAR J.C. : Chemistry of Coordination Compounds, Reinhold, New-York, 1956.
- 11 - BANNERMAN R.M., et al : Br. med. J., 1962, 2, 1573-1577.
- 12 - BARNETT R., et al : J.B.C., 1966, 241, 1483.
- 13 - BASOLO F., PEARSON R.G. : Mechanisms of Inorganic Reactions, Wiley, New-York, 1967.
- 14 - BASTIDE P., BAUDON J., DASTUGUE G., REBIERE J.P. : Ann. Biol. Clin., 1960, 18, 307.
- 15 - BESSMAN S.P. : Ann. Internal. Med., 1957, 47, 1036.
- 16 - BICKEL H., et al : Experientia, 1960, 16, 129.
- 17 - BIRCH A.J. : Proc. Chem. Soc., 1957, 233.
- 18 - BOHNE F. : Strahlentherapie, 1972, 143, 106-112.
- 19 - BOULET P., et al : Sem. Hôpitaux, 1958, 34, n° 8.
- 20 - BRACK N. : Arzneimittel-Forsch., 1964, 14, 883.
- 21 - BROCKMANN H., SCHMIDT-KASTNER G. : Chem. Ber., 1955, 88, 57.
- 22 - BUSH J., et al : J. Pharmacol., 1945, 85, 237.

- 23 - CABAUD P.G., WROBLEWSKI F. : Amer. J. Clin. Path., 1958, 30, 234.
- 24 - CARPY S. : Biochem. Biophys. Acta., 1968, 151, 245.
- 25 - CATSCH A. : Federation Proc., 1961, 20 (suppl. 10, Part II), 206.
- 26 - CAVALLINI D., et al : Archs. Bioch. Biophys., 1969, 130, 354.
- 27 - CEMBER H. : Ind. Hyg. J., 1962, 23, 304-313.
- 28 - CEMBER H., et al : Proc. 14th Intern. Congr. Occupational Health, Intern. Congr. Ser. 62, vol. II, 440-442, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1964.
- 29 - CHENOWETH M.B. : Pharmacol. Revs., 1956, 8, 57.
- 30 - CIER A. : Soc. Fr. des Docteurs en Pharmacie, 1970.
- 31 - CLARK W.G., GEISSMAN T.A. : J. Pharmacol. and Exper. Therap., 1949, 95, 363-381.
- 32 - COHN M., HUGHES T.R. : J.B.C., 1962, 237, 176.
- 33 - COLOT M. : Notions techniques de pharmacologie générale, Masson et Cie, Ed. 1972.
- 34 - COOK A.H., et al : J. Chem. Soc., 1956, 4130, 4133.
- 35 - COUTTS R.T. : Can. J. Pharm. Sci., 1967, 1, 1.
- 36 - CRAWHALL J.C., THOMPSON C.J. : Science, 1965, 147, 1459.
- 37 - CRAWHALL J.C., et al : Br. Med. J., 1964, 1, 1411.
- 38 - CURRENT C., et al : J. Clin. Endocrin. Metab., 1960, 20, 13-20.
- 39 - DE MARCO C., BOGNOLO D. : Archs. Biochem. Biophys., 1962, 98, 526.
- 40 - DESHMUKH K., NIMNI M.E. : J. Biol. Chem., 1969, 244, 1787.
- 41 - DION H.W., et al : J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3075.
- 42 - DUEL D.H. : Biochem. Biophys. Acta., 1961, 48, 242.
- 43 - DUTCHER W. : J. Biol. Chem., 1944, 155, 359.
- 44 - EIGEN M., TAMM K. : Z. Electrochem., 1962, 66, 107.
- 45 - EIGEN M., WILKINS R.G. : Advan. Chem. Ser., 1965, 47, 55.
- 46 - ELLIS R.W. : Toxic. Appl. Pharmacol., 1967, 11, 104-113.
- 47 - ESPINASSE M. : Thèse Doctorat en Pharmacie, Clermont-Fd, 1972.

- 48 - EVANS N., RABIN B.R. : European J. Biochem., 1968, 4, 548.
- 49 - EWE K. : Klin. Wochschr., 1968, 46, 296.
- 50 - EYBL V. : Arzneimittel-Forsch., 1973, 23, 867-870.
- 51 - FABRE R., TRUHAUT R., BOUDENE C. : C.R. Acad. Sci., 1958, 3 (n° 246), 1086-1090.
- 52 - FIALIP J. : Thèse Doctorat en Pharmacie, Clermont-Fd, 1975.
- 53 - FIALIP J., PAYARD M., MALET P., TURCHINI J.P. et BASTIDE P. : J. Eur. Tox., 1974, 7 (2), 85-90.
- 54 - FIALIP J., PAYARD M., BASTIDE P. : Eur. J. Tox., 1975, 8 (6), 347-352.
- 55 - FITZHUGH O.G., et al : Arch. Ind. Hyg., 1950, 2, 433-442.
- 56 - FLETCHER M.J., SANADI D.R. : Archs. Biochem. Biophys., 1962, 96, 139.
- 57 - FLUHARTY A.L., SANADI D.R. : Archs. Biochem. Biophys., 1962, 97, 164.
- 58 - FOREMAN H., TRUJILLO T.T. : J. Lab. Clin. Med., 1954, 43, 566-71.
- 59 - FOREMAN H. : Drugs Enzymes, 1966, 4, 95.
- 60 - FOREMAN H. : J. Biol. Chem., 1953, 203, 1045-1053.
- 61 - FORSTER J. : Arch. Exp. Path. Pharmac., 1955, 225, 195-209.
- 62 - FOYE W.O. : Federation Proc., 1961, 20 (Suppl. 10, Part. II), 147.
- 63 - FREY P.A., et al : J.B.C., 1967, 242, 5369.
- 64 - GALLON M. : Thèse Doctorat en Pharmacie, Clermont-Fd, 1969.
- 65 - GEORGE P., GRIFFITH J.S. : The Enzymes, 2nd édition, vol. I, 1959.
- 66 - GIBSON F. : Biochem. Biophys. Acta., 1969, 192, 175.
- 67 - GOLDSTEIN A. : Principles of drug action. The basis of pharmacology , Harper and Row, Publishers, N.Y. and London, 1969.
- 68 - GUNSALUS I.C. : J. Cell. Comp. Physiol., 1953, 41 (51), 113.
- 69 - HARNED H.S., OWEN B.P. : The Physical Chemistry of Electrolytic Solution, 3rd ed., Reinhold N.Y., 1958.

- 70 - HASSINEN I., HALLMAN M. : Biochem. Pharmac., 1967, 16, 2155.
- 71 - HEDDLE J.G. : Can. J. Biochem. Physiol., 1963, 41, 1215-1222.
- 72 - HILL B.R. : Cancer Res., 1956, 16, 460.
- 73 - HOGENKAMP H.P.C. : Ann. Rev. Biochem., 1968, 37, 225.
- 74 - HURWITZ J. : J. Biol. Chem., 1955, 212, 757.
- 75 - IKEKAWA T. : J. Antibiotics (Japan) Ser. A., 1964, 17, 194.
- 76 - IRVING H., WILLIAMS R.J.P. : J. Chem. Soc., 1953, 3192.
- 77 - IRVING H., WILLIAMS R.J.P. : Nature, 1948, 162, 746.
- 78 - KAY A., MITCHELL P.C.H. : Nature London, 1968, 219, 267.
- 79 - KELLER-SCHIERLEIN W. : Forts. Chem. Organ. Natur., 1964, 22, 279.
- 80 - KLEIN L., NOWACEK C.J. : Biochem. Biophys. Acta., 1969, 194, 504.
- 81 - KOSOWER E.M. : B.B.A., 1962, 56, 474.
- 82 - LAURELL C.B. : The plasma Proteins (F.W. Putnam, ed.), vol. I, Academic Press N.Y.
- 83 - LEHNINGER A.L. : Biochemistry. The molecular basis of all structure and function, Worth Publishers INC, New-York, 1970.
- 84 - LEIGH J.S. : Ph. D. Dissertation, University of Pennsylvania, 1970.
- 85 - LENZ G.R., MARTELL A.E. : Biochemistry, 1964, 3, 745.
- 86 - LEVINE W.G. : Heavy metal antagonists in "Principles of drug action", Harper and Row, Publishers, N.Y. and London, 1969.
- 87 - LEY H. : Ber., 1909, 42, 354. Cf. KIRSON B. and BARSILY I. : Bull. Soc. Chim. France, 1957, 1336.
- 88 - MAHLER H., DOUGLAS J. : J.A.C.S., 1957, 79, 1159.
- 89 - MAL'TSEV N.I. : Biokhimiya, 1971, 36 (4), 761-768.
- 90 - MARTELL A.E., CALVIN M. : Chemistry of the Metal Chelate Compounds. Englewoods Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 1952.
- 91 - Mc CORMICK W.G., LEVEDAHL B.H. : B.B.A., 1959, 34, 303.
- 92 - Mc QUEEN M.J. : Ann. Clin. Biochem., 1972, 9 (Part. 1), 21-25.
- 93 - MELLOR D.P., MALLEY L. : Nature, 1947, 159, 370.

- 94 - MIKES O., TURKOVA J., SORM F. : Coll. Czech. Chem. Comm., 1963, 28, 1747.
- 95 - MIKES O., TURKOVA J., SORM F. : Coll. Czech. Chem. Comm., 1965, 30, 118.
- 96 - MILDVAN A.S. : Metals in Enzymes catalysis in The Enzymes II (3rd ed.), Academic Press N.Y. and London, 1970.
- 97 - MILLER V.L. : Toxicol. Appl. Pharmacol., 1961, 3, 459-468.
- 98 - MOESCHLIN S. : Poisoning, diagnosis and treatment. GRUNE and STRATTON, N.Y. and London, 1964.
- 99 - NEVILLE R.G., GORIN G. : J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 4891.
- 100 - NIGROVIC V. : Arzneimittel-Forsch., 1963, 13, 787-792.
- 101 - NIMNI M.E. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 25, 434.
- 102 - NIMNI M.E., BAVETTA L.A. : Science, 1965, 150, 905.
- 103 - NORSETH T. : Biochem. Pharmacol., 1968, 17, 581-593.
- 104 - OHNISHI M., URRY D.W. : Biochem. Biophys. Research Comm., 1969, 36, 185.
- 105 - ORGEL L.E. : An introduction to transition metal chemistry : Ligand field theory, Wiley, New-York, 1960.
- 106 - PALMER G., BRINTZINGER H. : in "A Treatise on Electron and Coupled Energy Transfer in Biological Systems. Klingenberg and King, eds., 1970.
- 107 - PATRICK J.B., WILLIAMS R.P., WEBB J.S. : J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 6689.
- 108 - PERRY H.M. : J. Clin. Invest., 1959, 38, 1452-1463.
- 109 - PINNELL S.R. : Science, 1968, 161, 475.
- 110 - PIPER C. : J. Agric. Science, 1942, 32, 143.
- 111 - PROUT T.E. : Metabolism, 1958, 7 - 240.
- 112 - PULLMAN A. : Quantum Biochemistry. Wiley's Inter-Science Division, New-York, 1963.
- 113 - RECIGNO A., SEGRE G. : Drug and Tracer Kinetics. Blaisdell Publ. Co., Waltham, Massachusetts, 1966.
- 114 - REISS O.K. : J. Biol. Chem., 1958, 233, 789.
- 115 - RETEY J. : Experientia, 1966, 22, 502.

- 116 - REYNOLDS W.L., LUMRY R. : Mechanisms of Electron Transfer. Ronald Press, New-York, 1966.
- 117 - RINGBOM A. : Complexation in Analytical Chemistry. Interscience Publishers, New-York, 1963.
- 118 - RINGBOM A. : "Complexation reactions", in Kolthoff I.M. Elving P.J., eds, Treatise on Analytical Chemistry, Part. I, vol. 1, Interscience New-York-London, 1959.
- 119 - RINGBOM A. : J. Chem. Educ., 1958, 35, 282.
- 120 - ROGERSON K.M., ARONSON A.L. : Biochem. Pharmacol., 19, 24, 2299-2305.
- 121 - ROGERSON K.M., ARONSON A.L. : Biochem. Pharmacol., 19, 24, 2293-98.
- 122 - ROSSOTTI F.J.C., ROSSOTTI H. : The determination of Stability Constants. Mc Graw Hill, New-York, 1961.
- 123 - SCHRAUZER G.N., DEUTSCH E. : J.A.C.S., 1969, 91, 3341.
- 124 - SCHUBERT J. : Iron Metabolism CIBA Symposium, 1964, 466.
- 125 - SCHWARZENBACH G. : in "Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry", vol. III, Academic Press, New-York, 1961.
- 126 - SCHWARZENBACH G. : Helvet. Chim. Acta., 1963, 46, 1390.
- 127 - SCHWARZENBACH G. : Experientia Suppl., 1956, 5, 162.
- 128 - SEN D.N. : J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 211.
- 129 - SEVEN M.J. : in "Metal-binding in medicine". Lippincott Co., Philadelphia, 1960.
- 130 - SHIMAN R. : Biochemistry, 1965, 4, 2233.
- 131 - SIDGWICK N.V. : J. Chem. Soc., 1941, 433.
- 132 - SIEGEL G.J., ALBERS R.W. : J. Biol. Chem., 1967, 242, 4972.
- 133 - SNOW G.A. : Biochem. J., 1965, 97, 166.
- 134 - SPENCER H. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 88, 435-449.
- 135 - STERNLIGHT H. : J. Chem. Phys., 1965, 43, 3123-3133.
- 136 - STRICKS W., KOLTHOFF I.M. : J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 5673.
- 137 - TAKENAKA S., SCHWERT I. : J. Biol. Chem., 1956, 223, 157.
- 138 - TAUBE H. : Adv. Chem. Ser., 1965, 49, 107.

- 139 - TOMPSETT S.L. : J. Clin. Path., 1959, 12, 219.
- 140 - TROLL W. : J. Nat. Cancer Instit., 1969, 43, 283.
- 141 - TRUHAUT R., BOUDENE C., JOUANY J.M. : "Hépatonéphrites Toxiques"
(comptes rendus de la 8e réunion des Centres de lutte contre les
poisons. Grenoble, 1967), 1968, 36.
- 142 - TRUHAUT R., BOUDENE C., JOUANY J.M. : Ann. Biol. Clin., 1968, 26,
10-12, 1267-1273.
- 143 - TSCHUGAEFF L., SERBIN E. : Compt. rend., 1910, 151, 1361.
- 144 - TURKOVA J., MIKES O., SORM F. : Experientia, 1963, 19, 633.
- 145 - UITTO J. : Biochem. Biophys. Acta., 1969, 194, 498.
- 146 - ULFVARSON U. : Toxic. Appl. Pharmacol., 1969, 15, 517-531.
- 147 - UMEZAWA H., et al : J. Antibiotics (Japan), Ser. A., 1966, 19, 210.
- 148 - UUSITALO E. : Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A. II, 1957, 87.
- 149 - VAN UITERT L.G., FERNELIUS W.C. : J. Am. Chem. Soc., 1954, 76,
- 150 - VIGNOLI L., et al : Chimie Anal., 1963, 45, 53.
- 151 - WALLENFALLS K., SUND H. : Biochem. Z., 1957, 329, 59.
- 152 - WEBB E.C., VAN HEYNINGEN R. : Biochem. J., 1947, 41, 74.
- 153 - WEBB J.L. : Enzymes and Metabolic Inhibitors. Vol. II. Academic
Press, New-York and London, 1966.
- 154 - WEBB M. : Biochem. Biophys. Acta., 1962, 65, 47.
- 155 - WERNER A. : Ber., 1908, 41, 1062.
- 156 - WHITTAKER V.P. : Biochem. J., 1947, 41, 52.
- 157 - WILLIAMS R.J.P. : in "The Enzymes", vol. I, by BOYER, LARDY,
MYRBACK. Academic Press, New-York.
- 158 - WIPF H.K. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 36, 387.
- 159 - WYSOR M.S. : Chemotherapy, 1973, 17, 188-199.
- 160 - YATSIMIRSKII K.B., VASILEV V.P. : Instability Constants of
Complex Compounds. Pergamon Press, New-York, 1960.
- 161 - ZAGALAK B. : J.E.C., 1966, 241, 3028.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES.....	3
Chapitre I	
Cations métalliques et chélation.....	4
I. Généralités.....	4
II. Stabilité des complexes formés.....	4
1. Facteurs liés aux propriétés électroniques du cation métallique	
2. Facteurs liés au ligand donneur d'électrons Théorie du champ de ligand	
III. Aptitude des métaux à se complexer.....	7
IV. Mécanisme de la chélation.....	8
Chapitre II	
La chélation en biochimie.....	9
I. Généralités.....	9
II. Chélateurs naturels.....	10
1. Acides aminés	
2. Acides organiques	
3. Bases azotées - Nucléotides	
4. Coenzymes	
5. Protéines	
6. Chélateurs chez les végétaux	
7. Chélateurs des microorganismes	
Chapitre III	
Chélation et activité pharmacologique.....	32
I. Généralités.....	32
II. Différentes activités pharmacologiques.....	35
1. Action diabétogénique	
2. Activité antibactérienne	
3. Activité antivirale	
4. Activité angioprotectrice	

5. Activité antipyrétique
6. Activité carcinogénique
7. Activité radioprotectrice
8. Activités diverses

Chapitre IV

Monographies.....	49
I. B.A.L.....	49
1. Structure	
2. Propriétés physico-chimiques	
3. Mécanisme d'action	
4. Pharmacologie	
5. Toxicité	
6. Absorption, distribution, excrétion	
II. E.D.T.A.....	52
1. Structure	
2. Propriétés physico-chimiques	
3. Pharmacologie	
4. Toxicité	
5. Métabolisme	
III. D.T.P.A.....	55
1. Structure	
2. Métabolisme	
IV. Pénicillamine.....	56
1. Structure	
2. Propriétés physiques	
3. Pharmacologie	
4. Toxicité	
5. Métabolisme	
V. Desferrioxamine.....	59
VI. Acide aurine tricarboxylique.....	59
VII. Acides hydroxamiques.....	60
RECHERCHES EXPERIMENTALES.....	61
Chapitre I	
Activités protectrices comparées de l'acide chromone carbo-	
hydroxamique -2 (sel sodique), de l'acide chromone carbo-	
xylique -2, de la methionine, de l'EDTA et de la pénicilla-	
mine.....	62

I. Protocole expérimental.....	62
II. Résultats obtenus.....	63
III. Conclusion.....	65
Chapitre II	
Activités protectrices comparées vis-à-vis de l'inhibition mercurique de la LDH <i>in vitro</i>	66
I. Etude biochimique de la LDH.....	66
II. Conditions expérimentales.....	67
III. Mode opératoire.....	68
IV. Résultats.....	68
V. Conclusion.....	71
Chapitre III	
Influence des différentes drogues sur l'élimination du mercure.....	72
I. Conditions expérimentales.....	73
II. Méthodes.....	74
1. Dosage du mercure dans les urines	
2. Dosage du mercure dans les fèces	
III. Résultats.....	76
1. Dans l'urine	
2. Dans les fèces	
IV. Conclusion.....	83
Chapitre IV	
Discussion sur la protection exercée.....	85
Résumé et conclusions.....	94
BIBLIOGRAPHIE.....	97

